

Aus dem Institut für Tierphysiologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Prof. Dr. W. Clauß

Untersuchungen zum Infektionsmechanismus von Eimerien

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Fachbereich Biologie/Chemie/Geowissenschaften

vorgelegt von
Jan Behrendt

Gießen, 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
2	Material und Methoden	13
2.1	Verwendete Parasiten	13
2.1.1	<i>Eimeria bovis</i>	13
2.1.2	<i>Eimeria separata</i>	14
2.1.3	<i>Toxoplasma gondii</i>	14
2.1.4	<i>N. caninum</i>	15
2.2	Zellkultur	15
2.2.1	Kultivierung der Zelllinien	16
2.2.2	Kryokonservierung der Zellen	17
2.2.3	Aussäen der Zellen für Experimente	17
2.2.4	Infektion der Zellen mit Kokzidien	18
2.3	Cell Wound Assay	18
2.4	Intrazelluläre Ionen-Messungen	20
2.4.1	Beladen der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen	21
2.4.2	Ablauf der intrazellulären Ionenmessungen	22
2.5	Patch-Clamp-Messungen	25
2.5.1	Aufbau des Patch-Clamp-Messstandes	25
2.5.2	Elektroden	27
2.5.3	Mechanischer Aufbau der Patch-Clamp-Apparatur und technische Probleme	28
2.5.4	Vorbereitung der Zellen für die Messung	30
2.5.5	Die unterschiedlichen Ableitungskonfigurationen	30

3	Ergebnisse	33
3.1	Die Untersuchungsmodelle	33
3.1.1	BSLEC infiziert mit <i>E. bovis</i>	33
3.1.2	HT29-Zellen infiziert mit <i>E. separata</i>	33
3.1.3	VERO-Zellen infiziert mit <i>E. bovis</i>	34
3.2	Alternativer Mechanismus der Zellinvasion	34
3.2.1	Kontrollversuche zum Cell Wound Assay	34
3.2.2	Alternativer Mechanismus der Zellinvasion bei Sporozoiten von <i>E. bovis</i> - Infektion verschiedener Zelllinien.....	36
3.2.3	Mechanismus der Zellinvasion bei Tachyzoiten von <i>T. gondii</i> und <i>N. caninum</i>	41
3.3	Die parasitophore Vakuole <i>E. bovis</i> -infizierter VERO-Zellen	42
3.3.1	Permeabilität der Membranen von Parasit und parasitophorer Vakuole	43
3.3.2	pH-Werte in verschiedenen Kompartimenten <i>E. bovis</i> -infizierter VERO-Zellen.....	44
3.3.3	Kalziumkonzentration in verschiedenen Kompartimenten <i>E. bovis</i> - infizierter VERO-Zellen	45
3.4	Intrazelluläre Kalziumkonzentration <i>Eimeria spp.</i> -infizierter Wirtszellen	45
3.4.1	Kalziummessungen mit Indo-1 – Probleme des optischen Systems bei gleichzeitiger Messung der Fluoreszenzintensitäten F405 und F460.....	46
3.4.2	Basale $[Ca^{2+}]_i$ in <i>E. bovis</i> -infizierten BSLEC.....	48
3.4.3	Das ATP-induzierte Ca^{2+} -Signal in BSLEC.....	49
3.4.4	$[Ca^{2+}]_i$ in <i>E. separata</i> -infizierten HT29-Zellen	54
3.5	Elektrophysiologie.....	56
3.5.1	Schwierigkeiten bedingt durch die HT29/B6-Zellen.....	56

3.5.2	VERO-Zellen.....	57
3.5.3	BSLEC.....	60
3.6	Egress von Sporozoiten aus infizierten Zellen.....	64
3.6.1	Egress von Sporozoiten durch Beeinflussung der Wirtszelle bei Patch-Clamp-Experimenten.....	64
3.6.2	Egress von Sporozoiten durch gezielte Erhöhung der Kalziumkonzentration in der Wirtszelle.....	66
3.7	Egress von <i>N. caninum</i> -Merozoiten aus reifen Schizonten.....	71
4	Diskussion	72
4.1	Invasion.....	72
4.2	Die parasitophore Vakuole.....	76
4.3	Der Einfluss der Infektion auf die Ca^{2+} -Homeostase der Wirtszelle.....	80
4.3.1	Ca^{2+} -Konzentration in der ruhenden Zelle.....	81
4.3.2	Ca^{2+} -Konzentration nach Stimulation.....	83
4.4	Elektrophysiologie.....	85
4.5	Egress.....	89
4.5.1	Ca^{2+} -induzierter Egress der <i>E. bovis</i> -Sporozoiten.....	89
4.5.2	Ca^{2+} -induzierter Egress von Merozoiten aus reifen Schizonten.....	93
5	Zusammenfassung/Summary	95
6	Literaturverzeichnis	99
7	Danksagung	108
8	Versicherung	109

1 Einleitung

Kokzidien (Sporozoea, Apicomplexa, Protozoa) sind einzellige, intrazelluläre Parasiten, die in großer Artenfülle in verschiedenen Wirbeltieren vorkommen. Viele Arten der Kokzidien sind als Krankheitserreger von medizinischer Bedeutung. So gehören zum Beispiel die Gattungen *Plasmodium* und *Toxoplasma* (Erreger der Malaria bzw. der Toxoplasmose) zu dieser Unterklasse. Andere Kokzidien wie *Eimeria* oder *Babesia* verursachen zum Teil erhebliche ökonomische Schäden in der Tierproduktion. Aus der Gattung *Eimeria* parasitieren viele Arten in Rindern, Ziegen, Schweinen, Schafen, Hühnern und anderen Nutztieren und sind daher von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Die hohe, mitunter zum Tod führende Pathogenität der Eimerien beruht vor allem auf der Zerstörung der befallenen Wirtszellen, was zu großflächigen Epithelausfällen im befallenen Gewebe führen kann. (Dönges, 1988)

In der Rinderhaltung stellen durch Arten der Gattung *Eimeria* verursachte Kokzidiosen wirtschaftliche Probleme dar. Der weltweite jährliche finanzielle Verlust in der Rinderhaltung durch Kokzidienbefall wird auf über 700 Millionen US \$ geschätzt (Fitzgerald, 1980; Rommel, 2000). Von den 21 in Rindern nachgewiesenen Eimerienarten sind *Eimeria bovis* und *Eimeria zuernii* diejenigen mit der größten Pathogenität (Bürger, 1983). Diese Arten zeichnen sich durch große Schizonten I und ein tieferes Eindringen in die Darmwand aus. Dabei hat *E. bovis* auch das größte Reproduktionspotenzial (Ernst und Benz, 1981; Ernst und Benz, 1986). Im Verlauf schwerer Infektionen werden im Dickdarm massenhaft Epithelzellen an der Basis der Drüsen mit Schizonten II und Gamonten besetzt. Epithelien heben sich im Folgenden großflächig ab, und es befinden sich auf der Lamina propria diphtheroide Membranen aus Blut, Fibrin, Granulozyten, Bakterien, Oozysten und Epithelresten. Kälber, die an einer klinisch manifesten Kokzidiose erkrankt sind, zeigen nach Dauschies et al. (1986) folgende Symptome: Die Tiere leiden an einer Diarrhøe infolge einer hämorrhagischen, diphtheroid-nekrotischen Enteritis. Es kommt zu Fieber und Inappetenz bei gesteigertem Trinkbedürfnis. Die Kälber können infolge eines schweren Verlustes von Plasmaproteinen und Mineralstoffen und einer Exsikkose sterben. Während Durchfall und Tenesmus im Krankheitsverlauf einige Tage andauern, können

allgemeine Schwäche, Abmagerung und struppiges Haar oft noch für Wochen weiterbestehen (Bürger, 1983). Die pathologischen Veränderungen und klinischen Anzeichen, die mit einer *E. bovis* Infektion einhergehen, werden durch die Gamonten und Oozysten verursacht (Hammond, 1973).

Der Entwicklungszyklus von *E. bovis* mit geschlechtlicher und ungeschlechtlicher Vermehrung (Abbildung 1) entspricht dem typischen Lebenszyklus von einwirtigen Kokzidien.

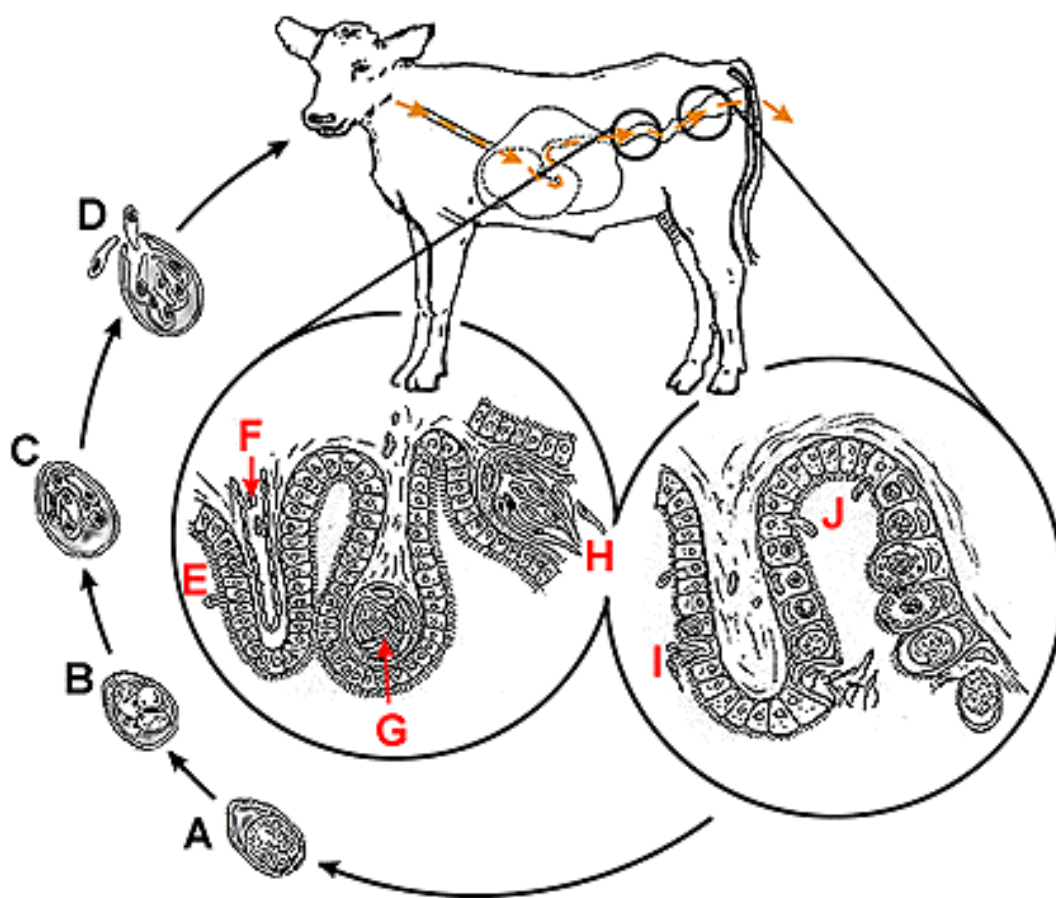


Abbildung 1: Entwicklungszyklus von *Eimeria bovis* (aus Johnstone, 2000). A-C: Sporulation der Oozyste außerhalb des Wirtstieres; D: Exzystierung der Oozyste und Freisetzung der infektiösen Sporozoiten im Verdauungstrakt des Wirtes; E-H: erste Schizogonie in lymphatischen Endothelzellen mit Sporozoit (E), Trophozoit in der Endothelzelle (F), Makroschizont (G) und Merozoiten (H); I: Merozoiten werden aus dem Schizonten II freigesetzt; J: Die Gamogonie beginnt mit dem Eindringen der Merozoiten in die Epithelzellen.

Die gesamte Entwicklung und Vermehrung findet im selben Wirt, jedoch in unterschiedlichen Geweben, statt. Nach Abschluss des Zyklus werden mit dem Kot unsporulierte Oozysten ausgeschieden, die innerhalb weniger Tage im Freien sporulieren und dann 4 Sporozysten mit je 2 Sporozoiten enthalten. Die Oozysten werden vom Rind mit der Nahrung aufgenommen und die darin enthaltenen 8 Sporozoiten anschließend im Verdauungstrakt freigesetzt. Nachdem sie in den Villi der zweiten Hälfte des Dünndarmes das Epithel durchwandert haben, befallen sie dort die Endothelzellen der zentralen Lymphkapillaren, wo sie die erste Schizogonie durchlaufen (Hammond et al., 1946).

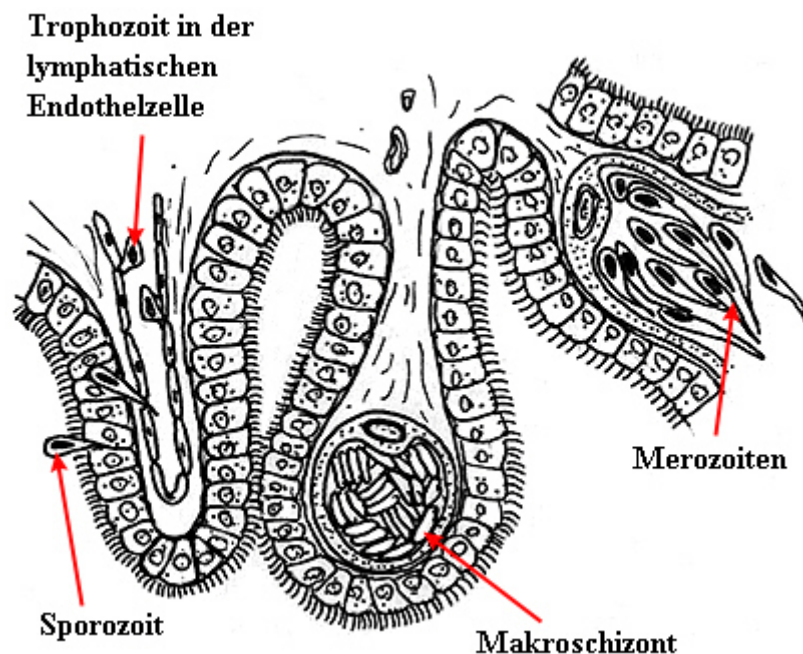


Abbildung 2: Erste Schizogonie im lymphatischen Endothel im Dünndarm (verändert nach Johnstone, 2000). Die im Darm frei gewordenen Sporozoiten durchdringen das Dünndarmepithel und gelangen so an die Lymphkapillaren, deren Endothelzellen die ersten Wirtszellen darstellen. Ist der Parasit in seiner Wirtszelle etabliert, findet eine Umformung zum Trophozoiten statt. Mit dem Wachstum des Trophozoiten erweitern sich auch die Zellgrenzen der Wirtszelle, und sie hebt sich aus dem Monolayer heraus. Wachstum und Zellteilung des Trophozoiten führen schließlich zur Bildung des Makroschizonten. Dieser erste Entwicklungsabschnitt endet mit der Freisetzung von ca. 120.000 Merozoiten/Schizont.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit befassten sich mit dieser ersten intrazellulären Phase im Entwicklungszyklus von *E. bovis*. Abbildung 2 zeigt diese Lebensphase von *E. bovis* im Detail. Die Sporozoiten verlieren ihre typische

„bananenförmige“ Gestalt und entwickeln sich zum runden Trophozoiten. Dieser beginnt zu wachsen, und durch Schizogonie entsteht der Makroschizont, der ca. 14-18 Tage nach Infektion eine Größe von etwa 300 µm erreicht.

Die aus den reifen Makroschizonten freigesetzten Merozoiten (ca. 120.000 pro Schizont) befallen das Epithel von Zäkum und Kolon, wo innerhalb von ca. 48 Stunden die Entwicklung zum Schizonten der 2. Generation stattfindet. Diese Schizonten der 2. Generation bilden 30–36 Merozoiten der 2. Generation, die nach Freisetzung in das Darmlumen benachbarte Epithelzellen befallen und sich dort zu Gametozyten entwickeln. Der weibliche Gametozyt wächst zum Makrogameten heran, und aus dem männlichen Gametozyten entstehen biflagellate Mikrogameten. Nach Befruchtung des Makrogameten durch den Mikrogameten entsteht die Oozyste, die nach Aufbrechen der infizierten Darmepithelzelle ca. 21 Tage nach Infektion mit dem Kot ins Freie gelangt. Frisch ausgeschiedene Oozysten müssen außerhalb des Wirtes zunächst die Sporulation durchlaufen, bevor sie infektiös werden. Die Sporulation dauert ca. 2 bis 3 Tage und führt zur Bildung von 4 Sporozysten mit je 2 Sporozoiten, die nach Aufnahme durch einen neuen Wirt wieder im Verdauungstrakt freigesetzt werden. (Hammond, 1973; Bürger, 1983)

In den letzten Jahrzehnten hat die Molekularbiologie enorme Fortschritte in der parasitologischen Forschung ermöglicht. Jedoch erst seit einigen Jahren halten auch physiologische Fragestellungen mehr und mehr Einzug in die aktuelle Forschung auf diesem Sektor. Das Interesse gilt hierbei der Physiologie des Parasiten, der Physiologie der Wirtszelle bzw. deren Veränderungen durch die Infektion sowie der Interaktion zwischen Parasit und Wirtszelle. Veröffentlichungen zu physiologischen Aspekten von Kokzidieninfektionen beschäftigen sich hauptsächlich mit den humanmedizinisch relevanten Vertretern *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium* spp. Für beide Parasiten existieren etablierte in vitro-Modelle in Form von Zellkultursystemen, die das Bearbeiten physiologischer Fragestellungen im Labor unter kontrollierten Bedingungen ermöglichen. Aber auch für andere Kokzidien oder ganz andere intrazelluläre Erreger wie Bakterien und Viren existieren Berichte über deren Einfluss auf die Physiologie der Wirtszelle. Besonders interessant (und fatal für den Wirtsorganismus) ist dabei der Einfluss auf Zellen, die der

Immunabwehr des Wirtes dienen. So bewirken eine Reihe potentiell tödlicher intrazellulärer Erreger, darunter *Leishmania*, *Yersinia* und *HIV*, Fehlfunktionen bei Lymphozyten. Die Erforschung der molekularen und zellphysiologischen Mechanismen, die der Infektion der Wirtszellen zugrunde liegen, ist aber auch bei solchen Wirtszellen von Bedeutung, die nicht direkt an der Immunabwehr beteiligt sind. Die Kenntnis dieser Mechanismen ist eine Voraussetzung für das Verständnis pathologischer Abläufe und kann von Bedeutung für die wirksame Bekämpfung der Parasiten und der durch sie angerichteten Schäden sein.

Das Ziel dieser Arbeit war es, mehr über die Mechanismen der Invasion und Persistenz von Kokzidien in ihren Wirtszellen zu erfahren. An in vitro Modellen wurden unterschiedliche Fragestellungen zum Mechanismus der Invasion der Wirtszelle durch den Sporozoiten und zu Wechselwirkungen zwischen dem intrazellulären Parasit und seiner Wirtszelle untersucht. Als Untersuchungsmodelle dienten hierbei epitheliale Zellen (humane Kolon-Adenokarzinom-Zellen, HT29/B6) und Nierenzellen aus der Afrikanischen Grünen Meerkatze (VERO), sowie endotheliale Zelllinien („Bovine spleen lymphatic endothelial cells“, BSLEC und „Bovine aortic endothelial cells“, BAEC), die mit Sporozoiten der Gattung *Eimeria* und zwar *E. separata* bzw. *E. bovis* infiziert wurden. Die Parasiten durchliefen in den kultivierten Zellen (außer in VERO-Zellen) den kompletten ersten intrazellulären Lebensabschnitt - vom Eindringen der Sporozoiten in die Wirtszelle bis zur Freisetzung der Merozoiten der 1. Generation in das Kulturmedium.

Das Eindringen der Kokzidien in ihre Wirtszelle wird klassischerweise als endozytoseähnlicher Vorgang beschrieben, bei dem zugleich die sogenannte parasitophore Vakuole (PV) gebildet wird. Allerdings gab und gibt es immer wieder Befunde, die sich mit dieser Theorie nicht decken. Erst vor kurzem wurde für *Plasmodium* ein „alternativer Mechanismus“ der Invasion beschrieben (Mota et al., 2001) und nach erneuter Betrachtung älterer Beobachtungen auch für andere Apicomplexa postuliert (Mota und Rodriguez, 2001). Mit Hilfe des „Cell Wound Assay“ (McNeil et al., 1999) wurde in dieser Arbeit die Invasion der Wirtszellen durch *E. bovis* Sporozoiten untersucht. Es sollte überprüft werden, ob dieser Mechanismus, bei dem keine PV gebildet, sondern die Membran der Wirtszelle beim Eindringen verletzt wird, auch bei *E. bovis* nachzuweisen ist.

Die PV ist für die Persistenz vieler intrazellulärer Parasiten in ihren Wirtszellen von zentraler Bedeutung, und in der Literatur werden die Eigenschaften und Funktionen ihrer Membran (PVM) als Grenze zwischen Parasit und Wirtszelle immer wieder kontrovers diskutiert (Übersicht in Lingelbach und Joiner, 1998). Untersuchungen zur PV wurden in dieser Arbeit mit VERO-Zellen als Wirtszellen für *E. bovis* durchgeführt, da in diesem System mit extrem großer PV die sichere Unterscheidung von Zytoplasma und Vakuole möglich war. Mit Hilfe der ionensensitiven Farbstoffe Carboxy-SNARF und Indo 1 konnten am Konfokalmikroskop pH-Wert und Ca^{2+} -Konzentration in verschiedenen Kompartimenten der infizierten VERO-Zellen gemessen werden. Mit dem Einsatz der membrangängigen (Acetoxymethylester-) Formen der Farbstoffe stand außerdem eine nichtinvasive Methode zur Verfügung, mit der die Permeabilität der PVM untersucht werden konnte.

Dem Kalziumion als ubiquitärem intrazellulärem Botenstoff gilt in der physiologischen Forschung generell eine besondere Aufmerksamkeit. Auch für intrazellulär parasitierende Protozoen hat sich gezeigt, dass Kalziumsignale im Zytosol des Parasiten und der Wirtszelle bei verschiedenen Prozessen im Infektionsgeschehen beteiligt sind. Kurzfristige oder auch anhaltende Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden bei der Invasion durch die Erreger und während der intrazellulären Phase beobachtet. Die Bedeutung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und deren Modulation durch intrazelluläre Pathogene scheint dabei von großer Bedeutung für das Überleben und die Entwicklung des Parasiten zu sein (Übersicht in Olivier, 1996). Für Infektionen mit Eimerien liegen bislang noch keine Daten vor, die eine Beteiligung von Ca^{2+} -Ionen bei der Invasion oder der intrazellulären Entwicklung zeigen. Um den Einfluss der Eimerieninfektion auf den Kalziumhaushalt und auf Kalzium-Signalwege der Wirtszellen zu untersuchen, wurde sowohl die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Wirtszelle gemessen, als auch das Kalziumsignal nach Stimulation mit einem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -erhöhenden Botenstoff.

Auch beim Egress intrazellulärer Parasiten aus ihren Wirtszellen scheinen Kalziumsignale beteiligt zu sein. In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass eine experimentell erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zum Egress intrazellulärer Stadien von *T. gondii* führt (Endo et al., 1982; Schwab et al., 1994; Stommel et al., 1997; Black et al., 2000). Bei in vitro-Kulturen von *Sarcocystis neurona* bewirkte die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die synchrone Freisetzung der Merozoiten aus

den reifen Schizonten (Ellison et al., 2001). In allen bislang hierzu veröffentlichten Arbeiten wurde die $[Ca^{2+}]_i$ auf sehr drastische Weise, z. B. durch Kalziumionophore oder Mikroinjektion, dauerhaft und außerhalb normaler physiologischer Werte erhöht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch eine moderate Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, hervorgerufen durch den extrazellulären Liganden ATP, zum Egress führen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Parasiten

Die Untersuchungen zum Infektionsmechanismus von Kokzidien wurden in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich am Beispiel des rinderpathogenen Kokzidiums *Eimeria bovis* durchgeführt. Daneben wurden in den Versuchen auch Sporozoiten von *E. separata* und Tachyzoiten von *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* eingesetzt. Die Gattungen *Toxoplasma* und *Neospora* gehören wie *Eimeria* zur Unterordnung der Eimeriina, werden aber nicht in die Familie der Eimeriidae sondern der Isosporidae eingeordnet.

2.1.1 *Eimeria bovis*

Der verwendete *E. bovis* Stamm wurde 1985 in Norddeutschland isoliert und durch Passagierung in Kälbern erhalten (Fiege et al., 1992). Die Produktion der Oozysten wurde am Institut für Parasitologie am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus Liebig Universität Gießen, wie bei Bürger et al. (1995) beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden Kälber im Alter von 7 Wochen oral mit 7×10^4 sporulierten Oozysten infiziert. Ausgeschiedene Oozysten wurden isoliert und zur Sporulation bei Raumtemperatur für eine Woche in 2 % (w/v) Kaliumdichromatlösung inkubiert, wobei durch Einblasen von Luft ständig für eine ausreichende Sauerstoffzufuhr gesorgt wurde. Nach erfolgter Sporulation wurde die Oozystensuspension zentrifugiert (10 min, 350 g) und das Pellet wurde in frischer 2 % (w/v) Kaliumdichromatlösung resuspendiert. So wurden die Oozysten dann bei 4° C bis zur Verwendung gelagert.

Zur Exzystierung der Sporozoiten wurde die Kaliumdichromatlösung durch Zentrifugation entfernt (10 min, 400 g). Das Pellet wurde in Na-Hypochloritlösung (4%) aufgenommen und 20 min auf Eis gerührt. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 300 g) befanden sich die Oozysten im Überstand. Der Überstand wurde 1+1 mit destilliertem Wasser verdünnt und 10 min bei 400 g zentrifugiert. Das Pellet mit den Oozysten wurde dann in Wasser aufgenommen, auf einen Gradienten einer 60 % Percoll-Lösung aufgetragen und 20 min bei 400 g zentrifugiert. Das Band mit den Oozysten wurde abgesaugt, auf einen weiteren

Gradienten (50 % Percoll) geschichtet und nochmals 20 min bei 400 g zentrifugiert. Die hieraus entnommene Oozystenfraktion wurde mit Wasser vermischt und wieder 20 min bei 400 g zentrifugiert. Das Pellet mit den aufgereinigten Oozysten wurde in einer sterilen Lösung von 0,02 M L-Cystein und 0,2 M NaHCO₃ aufgenommen und für 20 h bei 37 °C und 100 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (10 min bei 500g), das Pellet mit den Oozysten in Exzystiermedium („Hank’s Balanced Salt Solution“ (HBSS) mit 0,4 % (w/v) Trypsin und 8 % (v/v) steriler Rindergalle) aufgenommen und für 4 bis 5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dabei wurde die Freisetzung der Sporozoiten regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Die freien Sporozoiten wurden durch Zentrifugation von (10 min bei 200 g in PBS) von Oozysten Sporozysten und Debris getrennt und dann in Zellkulturmedium mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren und zur späteren Verwendung entweder in einer Gefriertruhe bei –80 °C oder in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Kryoröhrchen enthielten dabei 4×10^4 bis 2×10^6 Sporozoiten.

2.1.2 *Eimeria separata*

E. separata ist ein Kokzid der Ratte, das in vivo Epithelzellen des Dickdarms befällt. Die Produktion, Aufreinigung und Exzystierung der Oozysten wurde am Institut für Parasitologie am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus Liebig Universität Gießen nach der Methode von Kowalik und Zahner (1999) durchgeführt.

2.1.3 *Toxoplasma gondii*

Die *T. gondii*-Tachyzoiten (RH-Stamm, Sabin, 1941) wurden in BALB/c-Mäusen vermehrt. 48 Stunden nach der intraperitonealen Injektion der Parasiten wurden die Tachyzoiten aus der Peritonealhöhle isoliert und durch mehrmaliges Waschen mit PBS aufgereinigt. Dabei wurde jeweils für 10 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Vor der Weiterverwendung oder dem Einfrieren (s. oben) wurden die Parasiten noch ausgezählt. Für die Versuche wurden frisch isolierte Tachyzoiten vom Institut für Parasitologie am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus Liebig Universität Gießen zur Verfügung gestellt.

2.1.4 *N. caninum*

Für die Versuche wurden auch im Fall von *N. caninum* frisch gewonnene Tachyzoiten benutzt. Am Institut für Parasitologie am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus Liebig Universität Gießen wurde die Vermehrung der *N. caninum* Tachyzoiten (NC-1 Stamm, Dubey et al., 1988) in vitro in der Zellkultur (VERO) durchgeführt. Die Tachyzoiten wurden mit PBS von der Zellkultur gespült und ebenso wie *T. gondii* aufgereinigt und ausgezählt.

2.2 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden die kontinuierlichen Zelllinien HT29/B6 und VERO, sowie die primären Zelllinien BSLEC und BAEC verwendet. Alle diese Zelllinien sind adhärent und bilden in Kultur konfluente Monolayer.

HT29/B6-Zellen stammen aus einem menschlichen Kolon-Adenokarzinom. Die bereits 1964 isolierten HT29-Zellen wachsen in Kultur zu unpolarisierten Multilayern aus. Der 1991 durch glukosefreie Kultivierung erzeugte Subklon HT29/B6 zeichnet sich durch Differenzierung und Polarisierung der Zellen aus (Kreusel et al., 1991) und bildet in Kultur einen konfluenten Monolayer. Die Zelllinie wurde von M. Fromm (Berlin) zur Verfügung gestellt.

VERO-Zellen stammen aus der Niere der Afrikanischen Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*). Sie wurden über die „European Collection of Cell Cultures“ (ECACC no. 90050801) bezogen.

BSLEC (Bovine Spleen Lymphatic Endothelial Cells, Hermosilla et al., 2002) wurden von K. Preissner (Giessen) aus Lymphgefäßen der Milz vom Rind gewonnen. Über das Institut für Parasitologie wurden die kryokonservierten Zellen zur Verfügung gestellt.

BAEC (Bovine Aortic Endothelial Cells) wurden am Institut für Parasitologie durch Kollagenaseverdauung aus frisch entnommenen Rinderaorten gewonnen. Die Aorten wurden dazu für 20 Minuten bei 37° C und 5 % CO₂ in 0,02 % Kollagenase Typ II (Worthington Biochemical Group, Lakewood, USA) in PSA (Puck's Saline A, Sigma-

Aldrich) inkubiert. Die gewonnenen Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und direkt für die Versuche auf Deckgläsern ausgesät (siehe 2.2.3).

2.2.1 Kultivierung der Zelllinien

BSLEC, VERO und HT29/B6 wurden in Zellkulturflaschen (25 cm², Nunclon Flaschen mit Filterkappe, Nunc, Wiesbaden) bei 37 °C und 5 % CO₂ in gefilterter Luft kultiviert. Dreimal wöchentlich wurde das Medium gewechselt. Nach Erreichen der Konfluenz, was je nach Zelltyp oder Zelldichte beim Aussäen eine bis drei Wochen dauerte, konnten die Zellen umgesetzt werden. HT29- und VERO-Zellen wurden beim Umsetzen im Verhältnis 1:3, BSLEC im Verhältnis 1:2 verdünnt. Dazu wurden das Medium abgegossen, die Zellen mit 3 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, nach Dulbecco und Vogt, 1954) gewaschen und 1,5 ml Trypsin EDTA (Eurobio, Les Ulis Cedex, Belgien) zugegeben. Nach dem Ablösen der Zellen beendete die Zugabe von 3 ml fetalem Kälber-Serum (FKS, Eurobio) oder FKS-haltigem Kulturmedium die Trypsinreaktion. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (5 Minuten bei 200 g) wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden zur weiteren Kultivierung wieder in Zellkulturflaschen ausgesät. Bei der Subkultivierung der BSLEC wurde das Medium ECGM (**E**ndothelial **C**ell **G**rowth **M**edium, PromoCell, Heidelberg) mindestens 20 Minuten vor dem Umsetzen in einer neuen Flasche vorgelegt, um die Adhäsion der frisch ausgesäten Zellen am Boden der Kulturflasche zu verbessern. Jeweils am ersten Tag nach dem Umsetzen wurde das Kulturmedium gewechselt. BSLEC wurden nur etwa bis zur 10. Passage verwendet. Nach häufigeren Passagen zeigten die Zellen deutliche morphologische Veränderungen (starke Vakuolisierung, deutliche Vergrößerung der Zellen) und wurden dann nicht mehr weiter kultiviert.

Die Kulturmedien für die verschiedenen Zelllinien setzten sich wie folgt zusammen:

- HT29/B6: RPMI 1640 mit 10 % FKS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µg/ml Gentamycin (alle Medien und Zusätze von Eurobio).
- VERO: Medium wie bei HT29/B6, jedoch nur mit 5 % FKS.

- BAEC und BSLEC: Nach dem Isolieren bzw. beim Umsetzen der Zellen wurden diese in ECGM ausgesät. Danach wurde beim ersten oder zweiten Mediumwechsel auf „modifiziertes ECGM“ umgestellt. Das „modifizierte ECGM“ besteht aus einem 1:1 Gemisch von ECGM und M199 (Eurobio) mit 2 % FKS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µg/ml Gentamycin

2.2.2 Kryokonservierung der Zellen

Die Zellen wurden wie bei der Subkultivierung in Suspension gebracht und nach dem Zentrifugieren in Medium mit 7,5 % DMSO (Sigma) resuspendiert. Diese DMSO-haltige Zellsuspension wurde langsam eingefroren (30 Minuten bei +4 °C, 2 Stunden bei -25 °C, 1 Stunde bei -80 °C) und schließlich, zur langfristigen Lagerung, in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

Das Auftauen erfolgte im Gegensatz zum Einfrieren in kurzer Zeit im Wasserbad bei 37 °C. Die aufgetauten Zellen wurden zentrifugiert (5 Minuten, 200 g), in Zellkulturmedium aufgenommen und in die vorbereitete Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.3 Aussäen der Zellen für Experimente

Die Zellen wurden entweder auf runde Deckgläser (Menzel-Gläser, Ø 15 mm, neoLab, Heidelberg) in 4-Well Platten (Nunc) oder in Glasbodenschalen (Abbildung 3) ausgesät. Die Glasbodenschalen wurden zu diesem Zweck selbst angefertigt. In den Boden der Zellkultur-schalen (Ø 3 cm, Nunc) wurde ein Loch gebohrt (Ø 8 bis 18 mm) und mit einem runden Deckglas (Ø 12, 15 oder 25 mm) verschlossen, welches mit Silikonkleber dauerhaft unter den Boden der Schale geklebt wurde. Vor Benutzung in der Zellkultur wurden die Schalen durch Gammastrahlung sterilisiert (4 h, 10 Gy/min). Zur

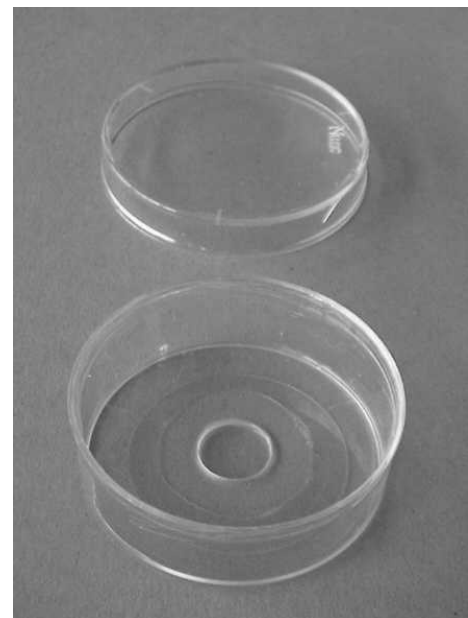


Abbildung 3: Glasbodenschale mit Deckel

Bestrahlung an der Kobalt-Quelle am Strahlenzentrum der Justus-Liebig-Universität wurden die Schalen mit einem handelsüblichen Haushalts-Folienschweißgerät in Folienbeutel eingeschweißt, um sie so nach der Bestrahlung bis zur Verwendung steril aufzubewahren. Nach der Benutzung wurden die Schalen gesäubert, mit destilliertem Wasser gespült und nach erneuter Sterilisation wiederverwendet. Die Zellkulturschalen selbst sind für einige Messungen ungeeignet, da eine ausreichende Durchlässigkeit für UV-Licht (z. B. zur Anregung von Indo-1) nicht gegeben ist. Wie bei der Subkultivierung in Flaschen wurde das Medium am ersten Tag nach dem Aussäen gewechselt.

2.2.4 Infektion der Zellen mit Kokzidien

Die Zellen wurden frühestens am 2. Tag nach dem Aussäen auf die Deckgläser mit den Kokzidien infiziert. Bei *T. gondii* und *N. caninum* wurden stets frisch isolierte Tachyzoiten verwendet, während bei *E. separata* und *E. bovis* kryokonservierte Sporozoiten benutzt wurden. Die gefrorenen Eimerien wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und mit 1 ml Kulturmedium in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zentrifugation erfolgte 5 min bei 300 g. Der Überstand wurde anschließend verworfen und die pelletierten Parasiten wurden in Kulturmedium resuspendiert.

Da die Produktion und Isolierung der Parasiten ein aufwendiger Prozess ist, wurde die Anzahl der pro Versuch eingesetzten Parasiten möglichst minimiert. Um dennoch eine ausreichende Infektionsrate zu erhalten, wurde ein kleines Volumen der Suspension mit hoher Parasitendichte vorsichtig in die Mitte des Zellrasens pipettiert. Das Volumen des zugesetzten Mediums beim Resuspendieren wurde so gewählt, dass mit einem Volumen von 20–100 µl Parasitensuspension infiziert werden konnte. Die Anzahl der Parasiten betrug dabei je nach Versuch zwischen 5.000 und 100.000 Parasiten.

2.3 Cell Wound Assay

Der „cell wound assay“ (McNeil et al., 1999) ist eine Methode, um eine Verletzung und anschließende Heilung (Reparatur) der Zellmembran nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu ein fluoreszenzmarkiertes, membranimpermeables Dextran (Dextran, fluorescein, 10.000 MW, anionic, lysine fixable; Molecular Probes, Leiden, Niederlande; kurz FDxLys) vor der Inokulation in das Zellkulturmedium gegeben. Nur bei Verletzung

der Zellmembran kann das Dextran ins Zytosol gelangen, und nur nach Wiederverschließen der Membran verbleibt es dort. Diese Methode wurde verwendet, um eventuelle Verletzungen der Zellmembran im Zuge der Parasiteninvasion aufzuspüren. Dabei wurde die Invasion von *E. bovis* Sporozoiten in verschiedene Wirtszellen (BSLEC, BAEC, VERO und HT29) und auch die Invasion unterschiedlicher Parasiten (Sporozoiten von *E. bovis* und Tachyzoiten von *T. gondii* und *N. caninum*) in BSLEC untersucht.

FDxLys wurde als Stammlösung (25 mg/ml) in sterilem PBS angesetzt und zur Entfernung nicht gelöster Partikel zentrifugiert (5 min, 12.000 g). Für die spätere Verwendung wurden Portionen von 100 µl bei -20 °C eingefroren.

Die Deckgläser mit den Wirtszellen wurden nach Entnahme aus dem Brutschrank einmal mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit jeweils 225 µl FDxLys-Medium (5 mg/ml FDxLys in Zellkulturmedium) bedeckt. Um zu gewährleisten, dass die Zellen komplett mit FDxLys-Medium umspült waren, wurde dieses mehrfach abgenommen und wieder zugegeben. Die aufgetauten und abzentrifugierten Parasiten wurden in Zellkulturmedium resuspendiert. 20 µl der Parasitensuspension wurden dann mit je 5 µl FDxLys-Stammlösung gemischt. Zur Inokulation wurde diese FDxLys-Parasitensuspension (5 mg/ml FDxLys in Parasitensuspension) vorsichtig in die Mitte des Deckglases pipettiert. In Kontrollversuchen wurden statt der FDxLys-Parasitensuspension 25 µl FDxLys-Medium auf die gleiche Weise zugegeben. Die Zellen wurden anschließend ein bis zwei Stunden im Brutschrank inkubiert.

Als Positivkontrolle wurden etwa 30 Minuten nach der Infektion in einer nicht infizierten Kontrollkultur mit einer spitzen Skalpellklinge einige Zellen mechanisch verletzt. Die verletzten Zellen nahmen das Dextran auf und dieses verblieb auch in den Zellen, nachdem sich die Membran nach der Verletzung wieder geschlossen hatte.

Nach Ende der Inkubationszeit von ein bis vier Stunden wurde nicht aufgenommenes Dextran durch Waschen mit PBS von der Kultur entfernt. Die Deckgläser wurden den Multischalen entnommen, vorsichtig am Rand mit einem Papiertuch abgetupft um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen, in Petrischalen mit 3 ml PBS überführt und darin nochmals mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen für 15 min in 3,5 % Formaldehyd. Die Zellen wurden auf Objektträgern mit Mowiol (Hoechst)

eingedeckt und über Nacht im Dunklen bei 4 °C zum Auspolymerisieren des Einbettmediums aufbewahrt.

Zum Betrachten und Auswerten wurden die gefärbten Präparate im Fluoreszenzmikroskop (Olympus BH2-RFC, Olympus, Hamburg) mit Licht der Anregungswellenlänge 488 nm bestrahlt und mit einer digitalen Camera (Olympus Cammedia Master) fotografiert. Bei der Entnahme der Deckgläser aus den Kammern der Multischalen mit der Pinzette kam es in den Randbereichen immer wieder zu Verletzungen der Zellen, die zu deren Anfärbung führten. Zur Auswertung wurden daher nur Bildausschnitte aus der Mitte der Deckgläser gewählt, die keine solchen artifiziellen Veränderungen aufwiesen. Auf jedem Deckglas wurden 7 bis 10 Bildausschnitte ausgewertet, die je nach Vergrößerung und Zelldichte ca. 40 bis 250 Zellen enthielten. Es wurden jeweils die Anzahl der Zellen, die Anzahl der Parasiten sowie die Anzahl Dextran-positiver Zellen in einem Bildausschnitt bestimmt. Bei abgerundeten und abgelösten Zellen konnte zwischen verletzungsbedingter und endozytotischer Färbung nicht immer eindeutig unterschieden werden. Daher wurden nur intakte, adhärente Zellen in die Auswertungen einbezogen.

Da die Menge der Parasiten selbst in unterschiedlichen Bildausschnitten ein und desselben Deckglases erheblich variieren konnte, und andererseits die Anzahl Dextran-positiver Zellen von der Anzahl der Parasiten abhängig war, wurde für jeden Bildausschnitt der Quotient der Anzahl Dextran-positiver Zellen pro Anzahl der Parasiten errechnet. Für die statistische Auswertung wurde als „n“ die Anzahl untersuchter Bildausschnitte angegeben.

2.4 Intrazelluläre Ionen-Messungen

Die Messungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen wurden mit Hilfe sogenannter „Ratio-Farbstoffe“ durchgeführt. Bei den hier verwendeten Farbstoffen Indo-1 und Carboxy SNARF (beide Molecular Probes) ändert sich mit der Bindung des nachgewiesenen Ions (Ca^{2+} bzw. H^+) nicht nur die Intensität des Emissionslichtes, sondern es verschiebt sich auch das Emissionsspektrum. Das macht man sich zu Nutze, indem man die Emission gleichzeitig bei zwei verschiedenen Wellenlängen (λ_1 und λ_2) misst, die möglichst nahe an den Emissionsmaxima für den Farbstoff mit bzw. ohne das gebundene Ion liegen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass variierende Farbstoff-

konzentrationen sich in den Zellen in gleicher Weise auf die beiden Fluoreszenzintensitäten auswirken. Das Verhältnis dieser beiden Werte, das als Maß für die Ionenkonzentration dient, bleibt weitgehend unabhängig von der Farbstoffkonzentration und wird somit in erster Linie von der Ionenkonzentration bestimmt.

2.4.1 Beladen der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Zum Beladen der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen wurden die membrangängigen Acetoxymethylester (AM-Ester) Indo-1-AM und Carboxy-SNARF-AM verwendet. Diese Farbstoffe können als AM-Ester die Zellmembran leicht passieren. Im Zytosol werden die AM-Ester von unspezifischen Esterasen gespalten. Diese Hydrolyse ist zum einen essentiell für die Fähigkeit zur Ionen-Bindung der Farbstoffe, zum anderen sind die resultierenden geladenen Formen der Farbstoffe nicht membrangängig und verbleiben somit in der Zelle. Die AM-Ester sind als große ungeladene organische Moleküle sehr schwer löslich in wässrigen Lösungen. Daher wurden diese Farbstoffe zunächst in DMSO gelöst (2 mM Farbstoff in DMSO) und unmittelbar vor der Herstellung der Inkubationslösung 1:1 mit Pluronic F-127 (20 %, w/v, in DMSO, Molecular Probes) vermischt. Pluronic-F127 verbessert die Beladung der Zellen mit den Farbstoffen signifikant und wird üblicherweise als Hilfsmittel zum Lösen von AM-Estern verwendet. Vermutlich schließt dieses milde, nicht-ionische Surfactant die AM-Ester in Form von Mizellen ein und verhindert so deren Präzipitation. Diese Mizellen dienen dann wahrscheinlich als dauerhafter Nachschub für den von Zellen aufgenommenen AM-Ester (Kao, 1994). Die Farbstoff/Pluronic F-127 Stammlösung in DMSO wurde im Verhältnis 1:500 in extrazellulärer Lösung (s. u.) verdünnt. Die resultierende Inkubationslösung enthielt dann 2 μ M Farbstoff, 0,02 % (w/v) Pluronic F-127 und 0,2 % DMSO in extrazellulärer Lösung.

Die extrazelluläre Lösung für Messungen an HT29- und VERO-Zellen setzte sich folgendermaßen zusammen: 141 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM KH_2PO_4 , 0,9 mM MgSO_4 , 1,7 mM CaCl_2 , 25 mM Glukose und 10 mM HEPES. Die extrazelluläre Lösung für BSLEC (E2) entsprach der Lösung, wie sie auch für Patch-Clamp-Experimente benutzt wurde und war wie folgt zusammengesetzt: 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 10 mM NMDG, 10 HEPES, 15 Glukose.

Zur Färbung wurden die Zellen zunächst mit extrazellulärer Lösung gewaschen und dann zum Beladen mit den Farbstoffen ca. 45 Minuten in Inkubationslösung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder mit extrazellulärer Lösung gewaschen und mindestens weitere 20 Minuten inkubiert, um zu gewährleisten, dass alle AM-Ester in der Zelle gespalten wurden. Da die Farbstoffe in ihrer AM-Ester-Form eine von der Ionenkonzentration unabhängige Fluoreszenz aufweisen, wurde durch diesen Schritt sichergestellt, dass die Fluoreszenzmessungen nicht durch diese unspezifische Fluoreszenz verfälscht wurden.

2.4.2 Ablauf der intrazellulären Ionenmessungen

Die Messungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen wurden an einem Laser Scanning Konfokal Mikroskop (MRC-1024 Laser Scanning Confocal Imaging System, Bio-Rad Microscience Ltd, Hemel Hemsted, GB) durchgeführt. Das Anregungslicht wurde von einem Argon Ionen Laser (Coherent Innova Enterprise Ion Laser Model No. ENT R622, Coherent Laser Group, Santa Clara, USA) erzeugt, der sowohl Licht der für Carboxy-SNARF benötigten Anregungswellenlänge von 488 nm im sichtbaren Bereich, als auch der für Indo-1 benötigten Anregungswellenlänge von 351 nm im UV-Bereich emittiert. Die Auswahl der benötigten Wellenlängen für die Anregung geschah durch das Einsetzen entsprechender Filter in den Laserstrahlengang vor dem Eintritt in das inverse Mikroskop (Zeiss Axiovert 135 M, Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen, Jena). Die gesamte Apparatur wurde mit der Software „Laser Sharp“ (Version 3.1, Bio-Rad Microscience) von einem Computer (Prosignia 300, Compaq) gesteuert. Mit dieser Software wurden alle Einstellungen für die Messung vorgenommen und auch die Messdaten aufgezeichnet. Die zu untersuchenden Zellen wurden im Durchlicht mit Phasenkontrastoptik ausgewählt und mit einer über einen T2-Adapter angeschlossenen Spiegelreflexkamera (Contax 167 MT, Kyocera Corporation, Tokyo, Japan) fotografisch dokumentiert. Die Fotos wurden bei der Auswertung benutzt, um infizierte und nicht infizierte Zellen unterscheiden und die Messwerte den entsprechenden Zellen zuordnen zu können. Im Konfokaltbild selbst war nur schwer zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen zu unterscheiden. Das verwendete Konfokalmikroskop bot die Möglichkeit, die Fluoreszenz gleichzeitig in vielen verschiedenen in Form und Größe frei definierbaren Bereichen zu erfassen und

aufzuzeichnen. Auf diese Weise wurden in jeder Messung infizierte und nicht infizierte Zellen gleichzeitig unter identischen Bedingungen untersucht. Zur Untersuchung verschiedener Zellkompartimente wurden die Messbereiche so gewählt, dass diese jeweils innerhalb der unterschiedlichen Kompartimente lagen.

Die Messungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen wurden stets bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.4.2.1 Messungen der intrazellulären freien Kalziumkonzentration

Zur Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde Indo 1 mit UV-Licht der Wellenlänge 351 nm angeregt. Das Emissionslicht wurde von 2 Photomultipliern gleichzeitig bei den Wellenlängen $\lambda_1 = 405 \pm 17,5$ nm (F405) und $\lambda_2 \geq 460$ nm (F460) registriert. Diese beiden Wellenlängen liegen sehr nahe an den Emissionsmaxima für Indo 1 ohne (475 nm) und für Indo 1 mit gebundenem Kalzium (400 nm). Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten F405:F460 diene als Maß für die intrazelluläre Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$). Auf die Umrechnung des Quotienten F405:F460 in absolute Ca^{2+} -Konzentrationen wurde verzichtet.

Die Bestimmung der relativen Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ ist ausreichend um Effekte der Infektion auf den Kalziumhaushalt der Wirtszelle zu untersuchen. Zu Beginn jeder Messung wurde zunächst für mindestens eine Minute die basale $[Ca^{2+}]_i$ gemessen. Waren diese Werte während der gesamten Zeit stabil, wurde die jeweilige Testsubstanz zugegeben.

2.4.2.2 pH-Wert Messungen

Zur Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes wurde die Fluoreszenz von Carboxy-SNARF, die abhängig von der Protonenkonzentration ist, gemessen. Dazu wurden die mit Carboxy-SNARF beladenen Zellen mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt. Die Intensitäten der Fluoreszenz wurden bei $\lambda_1 = 540 \pm 15$ nm (F540) und $\lambda_2 \geq 680 \pm 16$ nm (F680) bestimmt. Diese Wellenlängen entsprechen zwar nicht genau den Emissionsmaxima von Carboxy-SNARF (580 nm für Carboxy-SNARF mit und 640 nm für Carboxy-SNARF ohne gebundenes Proton), aber die zellfreie in vitro-Eichung (Abbildung 4) zeigt, dass der Quotient F680/F540 für die Bestimmung physiologischer pH-Werte geeignet ist.

Die Ringerlösung zur pH-Eichung entsprach in der ionalen Zusammensetzung einer intrazellulären Lösung (130 mM KCl, 1 mM KH_2PO_4 , 0.9 mM MgSO_4 , 1,7 mM CaCl_2 , 25 mM Glukose und 30 mM HEPES; die verschiedenen pH-Werte wurden mit KOH eingestellt). Die Quotienten für die 9 verschiedenen pH-Wert Messungen zwischen pH 6,0 und pH 8,0 sind in Abbildung 4 gegen den pH-Wert aufgetragen. Die in den Messungen ermittelten Quotienten wurden mit Hilfe dieser Eichkurve in pH-Werte umgerechnet.

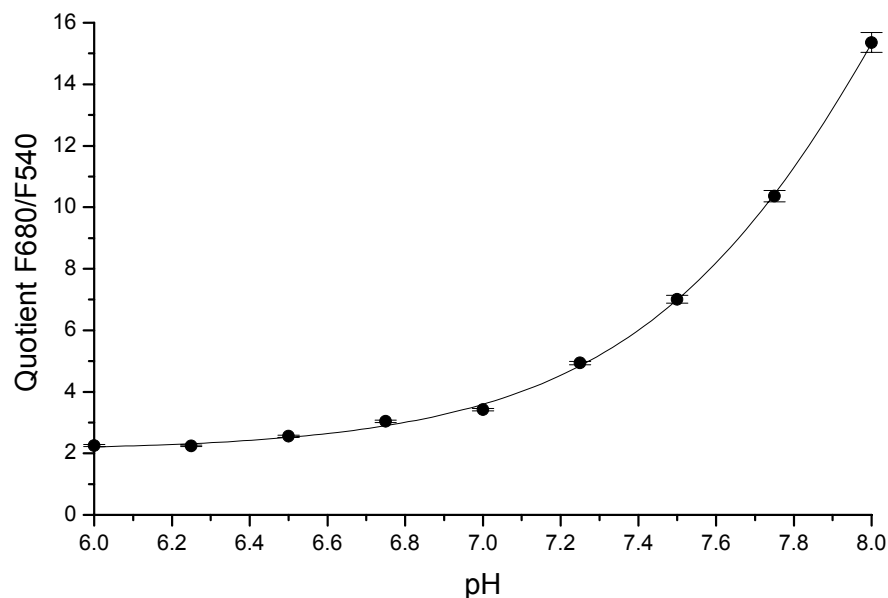


Abbildung 4: Eichkurve zur Umrechnung des Quotienten F680/F540 in den pH-Wert. Der Quotient F680/F540 steigt mit zunehmendem pH-Wert progressiv an. Für pH-Werte kleiner als 7,0 ändert sich der Quotient kaum. Für die intrazellulären pH-Werte der untersuchten Zellen (ca. 7,2 bis 7,4) ist die Steigung ausreichend groß, um verlässliche Ergebnisse zu erzielen. Die Kurve wurde mit Hilfe der Software „Origin“ (Microcal Software Inc., Northhampton, USA) an die Messwerte angepasst.

2.4.2.3 Auswertung und Statistik

Zur Auswertung und Darstellung wurden die am Konfokalmikroskop erhobenen Daten in das Programm „Origin“ (Microcal Software Inc., Northhampton, USA) importiert. Für die Berechnung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Prozent vom Basalwert wurde zunächst für jede Zelle einzeln der Quotient in Prozent des zugehörigen Basalwertes bestimmt. Von den so erhaltenen Prozent-Werten wurde dann der Mittelwert gebildet. Alle Messwerte in dieser Arbeit sind

als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM, standard error of the mean) angegeben; „n“ bezeichnet die Anzahl der untersuchten Zellen. Die Mittelwerte wurden mit Hilfe des t-Tests („Student’s t-test“) verglichen, wobei die Signifikanzschwelle auf $p \leq 0,05$ festgelegt wurde.

2.5 Patch-Clamp-Messungen

2.5.1 Aufbau des Patch-Clamp-Messstandes

Die Patch-Clamp-Messungen wurden unter optischer Kontrolle auf dem Objektisch eines inversen Mikroskopes (Axiovert 100, Carl Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Zusätzlich kann über eine am Mikroskop angeschlossene Schwarzweiß-CCD-Kamera (Sony SSC-M370CE) und den dazugehörigen Kamera-Adapter (Sony YS-W130P) das mikroskopische Bild auf dem Video Monitor (Sony PVM-122CE) dargestellt werden. Die Temperatur des Objektisches, der für die Aufnahme von 35 mm Petrischalen konzipiert war, konnte über einen Temperaturregler (Temperatur Controller II, Luigs & Neumann Feinmechanik und Elektronik GmbH, Ratingen) kontrolliert werden. Die aus Plexiglas gefertigte Messkammer (Abbildung 5) passte genau in eine 35 mm Petrischale, so dass sie für die Messung mit einer speziell dafür präparierten Glasbodenschale in den Objektisch eingesetzt werden konnte.



Abbildung 5: Patch-Clamp-Messkammer
Die Bohrungen in der Messkammer dienen der Aufnahme eines Schlauches für den Lösungszufluss, der Badelektrode und des Temperaturfühlers.

Das geringe Volumen der länglichen Kammer (ca. 500 μ l) konnte relativ zügig ausgetauscht werden. Dazu wurde durch eine Bohrung auf der einen Seite die extrazelluläre Lösung zugeführt und auf der anderen Seite aus einer Erweiterung der Kammer wieder abgesaugt. Der Durchfluss rief vor allem durch die absaugende Pumpe (Pumpe und Controller Typ MPCU, Lorenz Messgerätebau, Lindau) erhebliche elektrische Störungen

hervor. Deshalb wurde für laufende Messungen auf den Durchfluss verzichtet. Weitere seitliche Bohrungen dienten der Aufnahme der Badelektrode und eines Temperaturfühlers.

Die Aufnahme der Ionenströme erfolgte über chlorierte Silberelektroden, die mit der Elektrolytlösung in der Messkammer (Badelektrode) bzw. in der Patchpipette (Pipettenelektrode) in Verbindung standen. Die Patchpipette war über einen Pipettenhalter fest mit dem Vorverstärker verbunden. Der Vorverstärker wiederum war auf einer Kombination von Mikromanipulatoren (Mini25/Combi25, Luigs & Neumann) befestigt, mit deren Hilfe die Spitze der Patchpipette an die Zelle angenähert und aufgesetzt wurde. Die Badelektrode war durch ein Kabel mit dem Vorverstärker verbunden. Zur Minimierung elektrischer und mechanischer Störungen waren alle diese Komponenten auf einem schwingungsgedämpften Tisch innerhalb eines Faradayschen Käfigs aufgebaut. Abbildung 6 gibt einen Überblick über die Messanordnung.

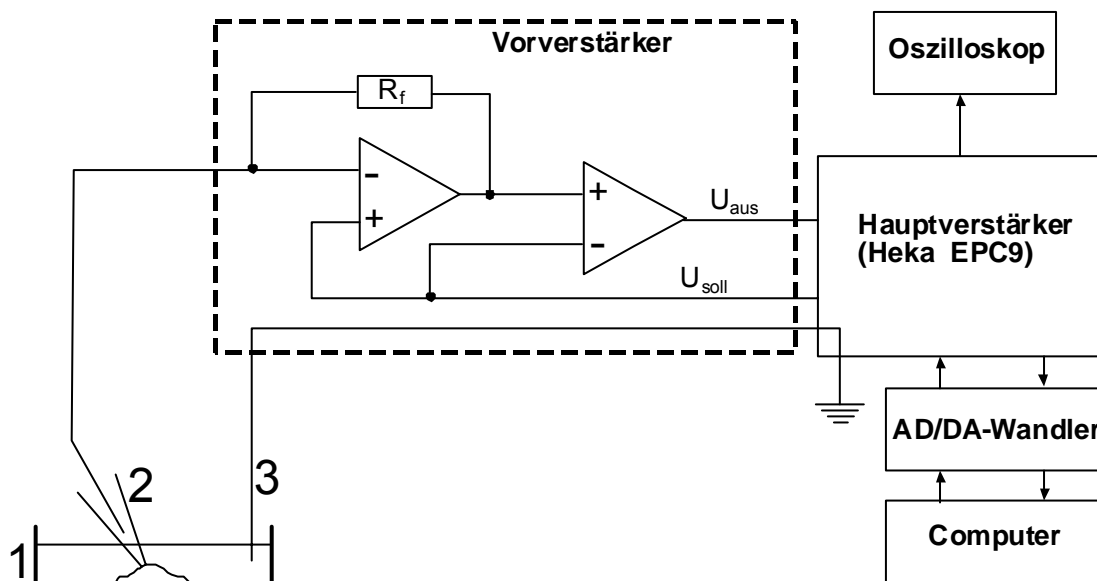


Abbildung 6: Schema der Patch-Clamp-Messapparatur. 1 Messkammer mit Badlösung, 2 Patchpipette mit Ableitelektrode und Zelle, 3 Referenzelektrode, R_f Rückkopplungswiderstand, U_{soll} Kommandospannung, U_{aus} Ausgangsspannung, die (Abhängig von R_f) in einen Strom umgerechnet wird (Messsignal).

Die über die Elektroden aufgenommenen Ströme wurden im Vorverstärker verstärkt, in Spannungssignale umgesetzt und an den Hauptverstärker (Patch-Clamp-Verstärker EPC9, HEKA Elektronik, Lambrecht) weitergeleitet. Nach der Endverstärkung und Aufbereitung

durch den EPC9 wurden die Daten über einen integrierten Analog/Digitalwandler (ITC-16 MAC Computer Interface) in den Computer (Power Macintosh 7100/66 AV, Apple Computer Inc., Cupertino, CA, USA) eingelesen. Zum ITC-16 gehörte neben dem im Verstärker integrierten „Interface Modul“ auch eine Steckkarte (MAC-23 Nubus Interface Board) welche, auf einer Nubus-Schnittstelle der Hauptplatine aufgesteckt, die Verbindung zum Computer darstellte. Außerdem wurden die Messsignale gleichzeitig auf einem Oszilloskop (Tektronix 2230, Tektronix, U.K. Ltd., London, England) dargestellt. Mit dem Computer und der entsprechenden Software (Pulse, Versionen 8.0 bis 8.53, Heka Elektronik) wurden nicht nur die Daten aufgenommen, sondern auch die Kommando-spannung (U_{soll}) über den Digital/Analogwandler-Teil des ITC-16 an den EPC9 gesendet.

Zur Datenanalyse und -aufbereitung kamen mehrere Programme zur Anwendung (TAC Single-Channel-Analysis Version 2.5, Bruxton Corporation, Seattle, WA, USA; Patch for Windows 9x/NT Version 1, Bernd Letz; Igor Pro 3.0 Wave Metrics Inc., Lake Oswego, Oregon, USA). Zur Übertragung auf den PC wurden die Dateien am Power PC auf „Mac-formatierte“ Iomega ZIP-Disketten oder CD-Roms gespeichert. Mit dem Programm „DSK/HFV Explorer“ (Version 1.3.1, Anygraaf) konnten die Dateien dann am PC eingelesen und in einem für das Betriebssystem MS Windows lesbaren Format auf der Festplatte abgespeichert werden.

2.5.2 Elektroden

Die Pipettenelektrode bestand aus einem am Pipettenhalter angelöteten Silberdraht, dessen chloriertes Ende ca. 1 mm in die Pipettenlösung der „Patchpipette“ eintauchte. Die Patchpipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Länge: 1 m, Außendurchmesser 1,6 mm, Innendurchmesser 1,2 mm, Hilgenberg GmbH, Malsfeld) hergestellt. Die Glaskapillaren wurden dazu in Stücke von ca. 8 cm Länge gebrochen und mit einem „Vertikalpuller“ (Narishige-Puller Vertikal PP-83, Bachofer Laboratoriumsgeräte GmbH, Reutlingen) in zwei Stufen auseinandergezogen. Die Pipettenspitze wurde dann in die Pipettenlösung eingetaucht um durch Kapillarwirkung die sehr dünne Pipettenspitze mit der Pipettenlösung zu befüllen („Tip-filling“). Anschließend wurde die Patchpipette von hinten mit Hilfe einer nichtmetallischen Kanüle (Microfil 28AWG, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) bis zu etwa einem Drittel mit Pipettenlösung befüllt

und die verbliebenen Luftblasen durch leichtes Klopfen entfernt. Die Pipettenlösungen wurden vor Benutzung stets gefiltert (Schleicher & Schüll FP 030/3 Einmal-Filterhalter, Rotrand 0,2 µm, NeoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg), um ein Verschmutzen oder gar Verstopfen der dünnen Spitze zu verhindern. Die Pipetten wurden direkt vor der Messung frisch ausgezogen, wobei die zweite nicht sofort genutzte Hälfte zunächst in einem geschlossenen Gefäß staubfrei aufbewahrt wurde. Brauchbare Patchpipetten zeigten bei frei in die Badlösung eingetauchter Pipettenspitze einen Widerstand von 5-10 MΩ. Über den Pipettenhalter und einen Silikonschlauch war die Glaspipette außerdem mit einem U-Rohr-Manometer verbunden, das die Erzeugung eines Über- oder Unterdruckes in der Patchpipette ermöglichte.

Als Badelektrode wurde ein chlorierter Silberdraht verwendet, der über eine Agarbrücke mit dem Bad in Verbindung stand. Zur Herstellung der Agarbrücke wurde der mit 100 mM KCl aufgekochte Agar in einen Kunststoffschlauch von etwa 6 cm Länge (Außendurchmesser 1,6 mm, Innendurchmesser 1,2 mm) etwa bis zur Hälfte aufgesaugt. Nach dem Erkalten des KCl-Agars wurde mit der nichtmetallischen Kanüle soviel KCl-Lösung (100 mM) luftblasenfrei darüber geschichtet, dass der chlorierte Silberdraht der Badelektrode 1 bis 2 mm in die Lösung eintauchte, wenn der Kunststoffschlauch im Elektrodenhalter befestigt wurde.

2.5.3 Mechanischer Aufbau der Patch-Clamp-Apparatur und technische Probleme

2.5.3.1 CCD-Kamera-bedingte technische Probleme

Bei der Annäherung der Patchpipette an die Zellmembran bewegte sich die Pipette hin und her, was an der Pipettenspitze einen bis wenige Mikrometer ausmachte. Diese mechanischen Schwingungen verhinderten die Ausbildung eines „Giga-Seals“. Die Heftigkeit der Bewegungen änderte sich in Abhängigkeit der Mikroskopbeleuchtung. Bei Erhöhung der Lichtintensität wurden die Schwingungen heftiger. Das Einbringen eines Graufilters in den Beleuchtungsstrahlengang führte wieder zu einer Abnahme der Bewegungen. Also kam nicht die Beleuchtung selber (Netzteil oder Lampe) als Ursache für die Schwingungen in Frage. Es zeigte sich, dass die am Mikroskop angeschlossene CCD-Kamera die Schwingungen hervorrief. Das Abschalten der automatischen Belichtung

resultierte in Schwingungen der Pipette, die nicht von der Lichtintensität, sondern von der manuell eingestellten Belichtungszeit, abhängig waren. Da sich die Schwingungen bei eingeschalteter Kamera nicht vermeiden ließen, konnten erfolgreiche Experimente nur bei ausgeschalteter Kamera durchgeführt werden.

2.5.3.2 Probleme bedingt durch die Halterung des Vorverstärkers

Während der Versuche traten nach einiger Betriebszeit langsame aber weiträumige Bewegungen der Patchpipette auf. Dies ging soweit, dass sich die Spitze der Patchpipette mitunter nicht mehr über der ursprünglich ausgewählten Zelle befand, sondern sich bis zu benachbarten Zellen entfernt hatte. Bewegungen der Patchpipette in senkrechter Richtung hatten dabei mitunter zur Folge, dass die Pipettenspitze den Boden der Messkammer erreichte und abbrach. Als Ursache für diese „Eigenbewegungen“ der Patchpipette konnte die Befestigung des Vorverstärkers am Mikromanipulator ermittelt werden.

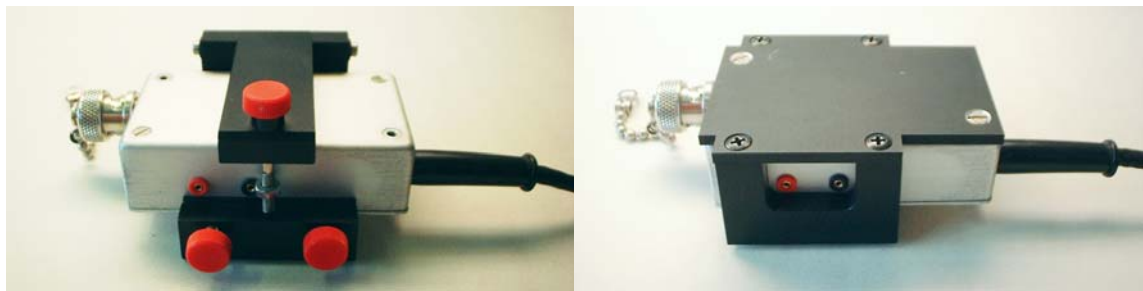


Abbildung 7: Halterung des Vorverstärkers in geklemmter- (links) und geschraubter Version (rechts). Bei der geklemmten Version wird der Vorverstärker auf der ganzen Breite von Ober- und Unterseite zwischen den Backen der Halterung eingeklemmt. Bei der geschraubten Version ist die Oberseite des Vorverstärkers über 2 diagonal gegenüberliegende Schrauben an der Halterung fixiert.

In der ursprünglichen von HEKA vorgesehenen Halterung wird der Vorverstärker eingeklemmt (siehe Abbildung 7, links). Während des Betriebes kommt es zu einer Erwärmung und Ausdehnung des Vorverstärker-Gehäuses was dann offensichtlich zu Spannungen zwischen der Halterung und dem darin eingeklemmten Vorverstärker führte. Die dadurch verursachten Bewegungen, die an der Pipettenspitze 10 µm und mehr betragen konnten, störten die Patch-Clamp-Messungen. Selbst wenn die Herstellung eines „Giga-Seals“ geglückt war, waren anschließende Messungen in der „Cell-Attached“- oder „Whole-Cell“-Konfiguration aufgrund dieser Bewegungen der Patchpipette unmöglich.

Durch den Austausch der Klemm-Halterung gegen eine geschraubte Version (Headstage-halterung für EPC-7/9 (EP), geschraubte Version, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen; Abbildung 7, rechts) konnte dieses Problem behoben werden, so dass damit auch länger dauernde Ganzzellableitungen an adhärenenten Zellen möglich waren.

2.5.4 Vorbereitung der Zellen für die Messung

Die Patch-Clamp-Experimente wurden an verschiedenen adhärenenten Zellen durchgeführt. An konfluenten Zellen zeigten sich erhöhte kapazitive Ströme und ein geringerer Eingangswiderstand, was sich durch die elektrische Kopplung benachbarter Zellen (vermutlich durch „Gap junctions“) erklären lässt (Nilius et al., 1997). Die kontrollierte Veränderung des Membranpotenzials in der „Whole-Cell“-Konfiguration war unter diesen Bedingungen nicht möglich, weshalb für Ganzzellableitungen darauf geachtet wurde, dass sich noch kein konfluenter Zellrasen gebildet hatte. Für Versuche an Zellen, die spätere Entwicklungsstadien der Parasiten enthielten, waren konfluente Monolayer naturgemäß nicht zu vermeiden. Hier wurden die Zellen durch den Einsatz von Trypsin und Ca^{2+} -freier Lösung zunächst vereinzelt. Dabei wurde die Konzentration und Wirkdauer so gewählt, dass die Zellen sich möglichst voneinander, nicht aber vom Substrat (dem Deckglas) lösten. Die in 4-Well-Platten (Nunc Multischalen) auf runden Deckgläsern kultivierten Zellen (siehe Abschnitt 2.2.3) wurden für die Messungen in die aus Plexiglas gefertigte Messkammer eingebracht. Dazu wurden die Deckgläser aus den 4-Well-Platten entnommen und unter den offenen Boden der Messkammer (Abbildung 5) gebracht. Anschließend wurde die Messkammer samt Deckglas mit Silikonfett auf den Boden einer Glasbodenschale geheftet. Es wurde zügig gearbeitet, um die Zellen möglichst schnell wieder mit extrazellulärer Lösung zu bedecken.

2.5.5 Die unterschiedlichen Ableitungskonfigurationen

Um Patch-Clamp-Messungen durchführen zu können, muss die Patchpipette eine elektrisch sehr dichte Verbindung mit der Zellmembran eingehen ("Giga-Seal", Hamill et al., 1981). Danach kann die für die Messung gewünschte Ableitungskonfiguration hergestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Messungen in der „Cell-Attached“- , in der „Whole-Cell“- sowie in der „Inside-Out“-Konfiguration durchgeführt. Abbildung 8

zeigt diese Konfigurationen und die Vorgehensweisen um sie zu erreichen. Bevor die Patchpipette in die Badlösung eingetaucht wurde, wurde mit Hilfe des U-Rohr-Manometers ein leichter Überdruck von ca. 50 mm Wassersäule auf die Pipettenlösung angelegt. Die dann ausströmende Pipettenlösung verhinderte zum Einen den Eintritt von extrazellulärer Lösung in die Pipette und zum Anderen, dass die Pipettenspitze durch Partikel auf der Oberfläche der Badlösung oder in der Badlösung verunreinigt wurde. Wenn das Anlegen eines Überdruckes auf die Pipettenlösung vor dem Eintauchen der Pipettenspitze in die extrazelluläre Lösung versäumt wurde, war die Erlangung eines Abdichtwiderstandes von mehr als 1 G Ω („Giga-Seal“) nicht mehr möglich.

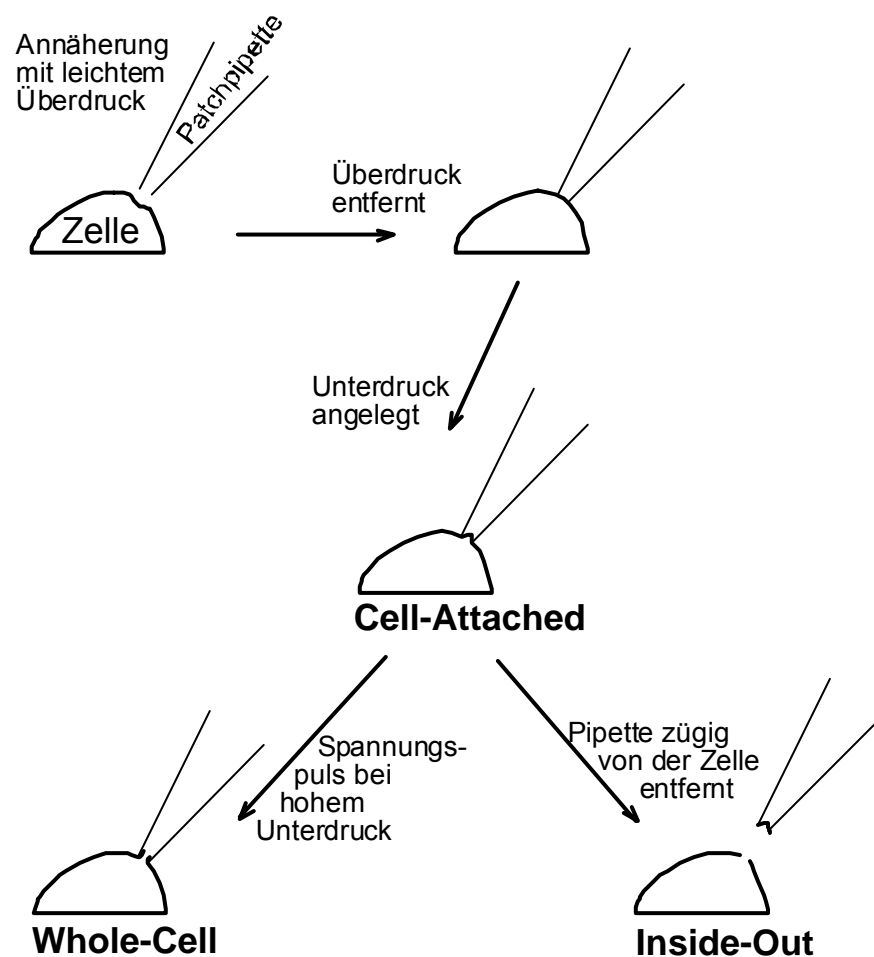


Abbildung 8: Verwendete Ableitungskonfigurationen: Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Ableitungskonfigurationen (verändert nach Hamill et al., 1981).

Mit Hilfe der Mikromanipulatoren wurde die Patchpipette ganz nahe an die Zellmembran der zu untersuchenden Zelle herangeführt. Wenn die Pipettenspitze nah genug an die Zellmembran angenähert war, konnte man beobachten, dass die austretende Pipettenlösung die Zellmembran leicht eindellte. Außerdem stieg der Pipettenwiderstand, der ständig kontrollierte wurde, dann leicht an. Der Pipettenwiderstand wurde durch das Anlegen eines Testpulses von 10 mV (Dauer 30 ms) und Messen des daraus resultierenden Stromes ermittelt. Nach Wegnahme des Überdruckes stießen Pipettenspitze und Zellmembran aneinander, so dass sich der elektrische Widerstand drastisch (auf etwa 100 MΩ) erhöhte. Beim Anlegen eines Unterdruckes erhöhte sich der Widerstand nochmals, im Idealfall auf mehrere (2-50) GΩ. Von dieser „Cell-Attached“-Konfiguration ausgehend wurde die „Inside-Out“-Konfiguration erreicht, in dem die Pipette in Pipettenachsenrichtung zügig von der Zelloberfläche entfernt wurde. Um die Konfiguration für „Whole-Cell“-Messungen zu erlangen, wurde bei einem relativ hohen anliegenden Unterdruck (400 bis 800 mm Wassersäule) ein Spannungspuls von -800 mV und 10 ms Dauer auf die Pipette gegeben. Um diesen Unterdruck zu erreichen, wurde ein neues U-Rohr-Manometer gebaut, mit dem in der Patchpipette ein Unterdruck von bis zu über einem Meter Wassersäule erzeugt werden konnte. Ein erfolgreicher Übergang in die „Whole-Cell“-Konfiguration zeigte sich in der deutlichen Verringerung des elektrischen Widerstandes bei gleichzeitiger Zunahme der kapazitiven Ströme.

3 Ergebnisse

3.1 Die Untersuchungsmodelle

Im Gegensatz zur strengen Wirts- und Gewebespezifität *in vivo*, konnte in Zellkultur gezeigt werden, dass die *Eimeria*-Sporozoiten durchaus Zellen unterschiedlicher Herkunft befallen. Eine erfolgreiche Invasion führte aber nicht in jeder Zelle auch zur Entwicklung und Vermehrung des Parasiten.

3.1.1 BSLEC infiziert mit *E. bovis*

Nach der Infektion der BSLEC mit *E. bovis*-Sporozoiten konnte unter dem Mikroskop immer wieder beobachtet werden, dass einzelne Parasiten die eben erst infizierte Wirtszelle nach kurzer Zeit wieder verließen und sich dann in typischer Weise über den Zellrasen bewegten ("gliding motility", besprochen in Sibley et al., 1998). Bei weiterer Beobachtung zeigte sich häufig, dass der Sporozoit später in eine andere Zelle eindrang. Nach dem Eindringen lag der Sporozoit für 3 bis 4 Tage morphologisch unverändert in der Zelle. Danach begann er sich abzurunden und etwa am fünften Tag nach der Infektion war der Parasit kaum mehr in der Wirtszelle zu erkennen. Lichtmikroskopisch war vom Parasiten zu diesem Zeitpunkt nur noch der refraktile Körper zu erkennen. Dem Entwicklungszyklus von *E. bovis* *in vivo* entsprechend dauerte auch im Zellkultursystem die erste Schizogonie sehr lange. Reife Schizonten von *E. bovis* waren in den BSLEC frühestens 3 Wochen nach der Infektion zu beobachten. Aufgrund dieser langen Entwicklungszeit war die Besonderheit der BSLEC, sich nach Erreichen der Konfluenz noch lange in Zellkultur zu halten, wesentlich für die erfolgreiche Entwicklung der *E. bovis*-Sporozoiten zum Schizonten I *in vitro*.

3.1.2 HT29-Zellen infiziert mit *E. separata*

Bei *E. separata* geht die Entwicklung vom Sporozoiten zum reifen Schizonten der ersten Generation deutlich schneller. Auch im Zellkultursystem vollzog sich die erste Schizogonie innerhalb von 24 Stunden, und gewöhnlich waren bereits 28 Stunden nach der Infektion freie Merozoiten im Medium zu finden (Behrendt et al., 2000).

3.1.3 VERO-Zellen infiziert mit *E. bovis*

Nach der Infektion von VERO-Zellen mit Sporozoiten von *E. bovis* bildet sich eine lichtmikroskopisch deutlich sichtbare, große parasitophore Vakuole. Im Mikroskop konnte man beobachten, wie sich die PV ausdehnte und nach mehreren Stunden war in der Regel eine ovale bis kreisrunde, große Vakuole zu beobachten (Abbildung 41 a, Seite 65). Der Parasit entwickelte sich in den VERO-Zellen nicht weiter, überlebte aber als Sporozoit bis zu 3 Wochen innerhalb der großen Vakuole (Behrendt et al., 2000). Diese Beobachtung wurde auch in einer anderen Arbeitsgruppe gemacht (Heise et al., 1997).

3.2 Alternativer Mechanismus der Zellinvasion

In der vorliegenden Arbeit wurde der „Cell Wound Assay“ verwendet, um das mikroskopisch beobachtete Phänomen des „Durchwanderns“ einer potentiellen Wirtszelle zu untersuchen. Bei diesem Vorgang dringt der Parasit in die Zelle ein, verlässt sie jedoch anschließend wieder. Der „Cell Wound Assay“ wurde eingesetzt, um zu überprüfen, ob dieser Vorgang mit einem alternativen Mechanismus zur Zellinvasion einhergeht, wie es schon für Sporozoiten der Gattung *Plasmodium* beschrieben wurde (Mota et al., 2001). Dabei wird die Zellmembran der Wirtszelle verletzt und verschließt sich anschließend wieder. Im Cell Wound Assay zeigte die Dextranfärbung von Zellen im Zellrasen an, dass sie auf die beschriebene Weise von einem Parasiten durchwandert wurden. So konnte das Auftreten dieses Phänomens in Abhängigkeit von verschiedenen Wirtszellen und Parasiten untersucht werden.

3.2.1 Kontrollversuche zum Cell Wound Assay

Bei nicht infizierten Zellen (Negativkontrollen) zeigten sich erwartungsgemäß keine Dextran-positiven Zellen (Abbildung 9). Endozytotisch aufgenommenes Dextran, welches vor allem nach längeren Inkubationszeiten zu beobachten war, zeigte, wie schon für andere Zellen beschrieben (McNeil et al., 1999), punktförmige Anfärbungen im Zytosol (Abbildung 10). Damit waren die endozytotisch angefärbten Zellen sehr gut von den „echten“ Dextran-positiven Zellen zu unterscheiden. In den Positivkontrollen (Abbildung 11) verteilte sich das bei Verwundung eingedrungene Dextran gleichmäßig in Zyto- und Nukleoplasma.

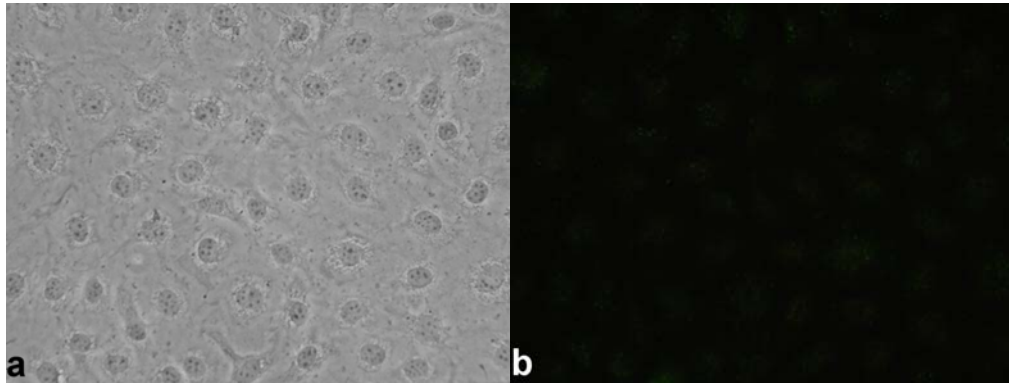


Abbildung 9: Cell Wound Assay bei BSLEC, negative Kontrolle. a) Nicht infizierte Zellen im Phasenkontrastbild. b) In den nicht infizierten BSLEC sind im Fluoreszenzbild keine Dextran-positiven Zellen zu sehen.

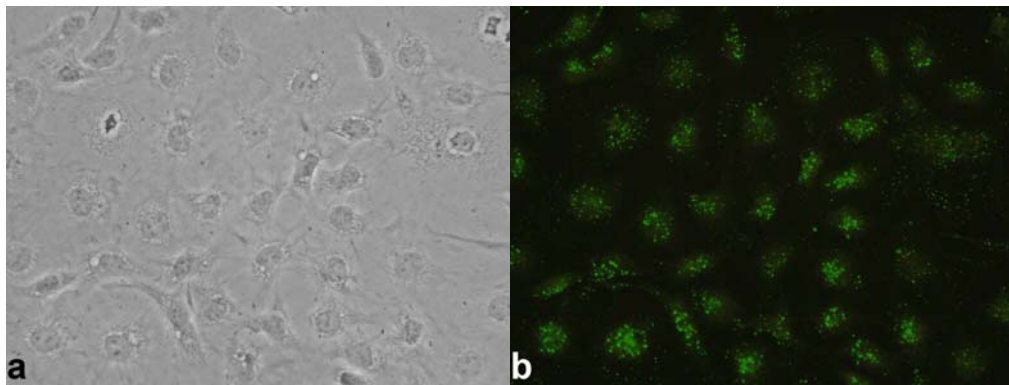


Abbildung 10: Cell Wound Assay bei BSLEC, negative Kontrolle mit endozytotisch angefärbten Zellen. Die in der Regel 2-stündige Inkubationszeit wurde hier auf 4 Stunden verlängert, was zu einer deutlichen endozytotischen Anfärbung führte. a) Nicht infizierte Zellen im Phasenkontrastbild. b) Im Fluoreszenzbild zeigen die Zellen eine für endozytotisch aufgenommenes Dextran typische Färbung.

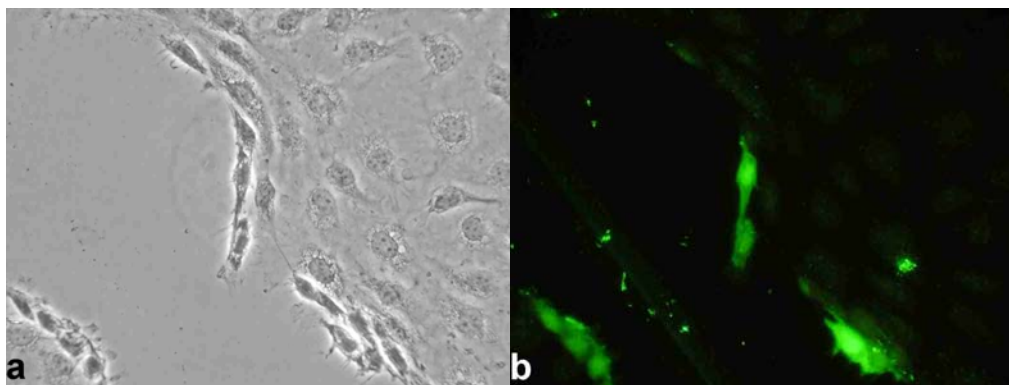


Abbildung 11: Cell Wound Assay bei BSLEC, positive Kontrolle. a) Im Phasenkontrastbild ist deutlich eine zellfreie Spur im Zellrasen zu sehen. Dort wurde der Zellrasen mit einer Skalpellklinge verletzt. b) Das Fluoreszenzbild zeigt Dextran-positive Zellen beidseitig der „Verletzungsspur“ im Zellrasen.

Die Dextran-positiven Zellen sind in der Positivkontrolle beidseitig entlang der „Kratzspur“ als hell fluoreszierende Zellen zu erkennen. Die Fluoreszenzintensität verschiedener positiver Zellen variierte in Abhängigkeit von der aufgenommenen Menge an Fluoreszenzfarbstoff, wobei in der Regel der Bereich des Zellkernes heller erschien als das Zytosol. Dass der Zellkern heller erscheint, hängt mit der „Spiegelei-Form“ der Zellen zusammen. Die Zellen sind sehr flach und die Region mit dem Zellkern ist deutlich dicker als der Rest der Zelle. Bei gleichmäßiger Verteilung ist die stärkste Fluoreszenz an der dicksten Stelle, also im Bereich des Zellkerns zu erwarten.

Die BAEC reagierten sehr empfindlich auf die Störungen durch den Cell Wound Assay (mehrmaliges Zugabe und Abnehmen des FDxLys-Mediums, mehrmaliges Waschen). Trotz vorsichtiger Handhabung lösten sich die Zellen meist voneinander und rundeten sich ab. Da sich bei abgerundeten Zellen der Farbstoff auf kleinerer Fläche konzentrierte, erschienen sie im Fluoreszenzbild generell sehr hell. Im Vergleich mit den Negativ- und Positivkontrollen war die Identifizierung „echter“ Dextran-positiver Zellen trotz dieser Schwierigkeit aber auch bei den BAEC möglich.

Die Vitalität, Beweglichkeit und Infektiosität von *E. bovis*-Sporozoiten sowie *T. gondii*- und *N. caninum*-Tachyzoiten wurde durch das FITC-Dextran nicht beeinflusst. Die Parasiten bewegten sich in typischer Weise gleitend über den Zellrasen und drangen in die angebotenen Zellen ein.

3.2.2 Alternativer Mechanismus der Zellinvasion bei Sporozoiten von *E. bovis*

- Infektion verschiedener Zelllinien

Im Cell Wound Assay zeigte sich, dass es bei der Infektion der BSLEC mit Sporozoiten von *E. bovis* zur Verletzung und anschließenden „Heilung“ der Zellmembran von Zellen im infizierten Zellrasen kommt. Das im Lichtmikroskop beobachtete „Durchwandern“ der Wirtszelle scheint also, wie auch für *Plasmodium* beschrieben (Mota et al., 2001), mit einem alternativen Mechanismus der Invasion der Wirtszellen verbunden zu sein. Um zu testen, ob dieser Vorgang abhängig von der Art der Wirtszelle ist, wurde der Cell Wound Assay mit verschiedenen Zelltypen durchgeführt. Als Wirtszellen dienten hierbei BSLEC (Abbildung 12), BAEC, VERO-Zellen (Abbildung 13) und HT29-Zellen (Abbildung 14).

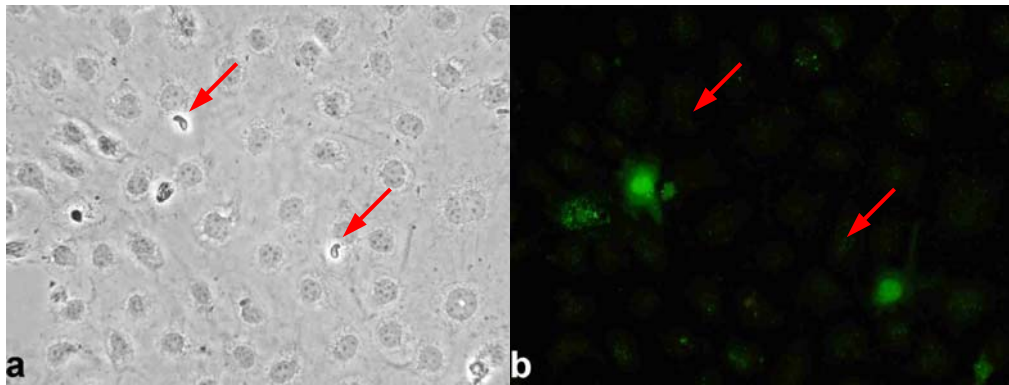


Abbildung 12: Cell Wound Assay mit BSLEC bei Infektion mit *E. bovis*-Sporozoiten. a) Im Phasenkontrastbild sind zwei *E. bovis*-Sporozoiten (markiert durch rote Pfeile) zu erkennen b) Das Fluoreszenzbild zeigt zwei Dextran-positive Zellen im Zellrasen.

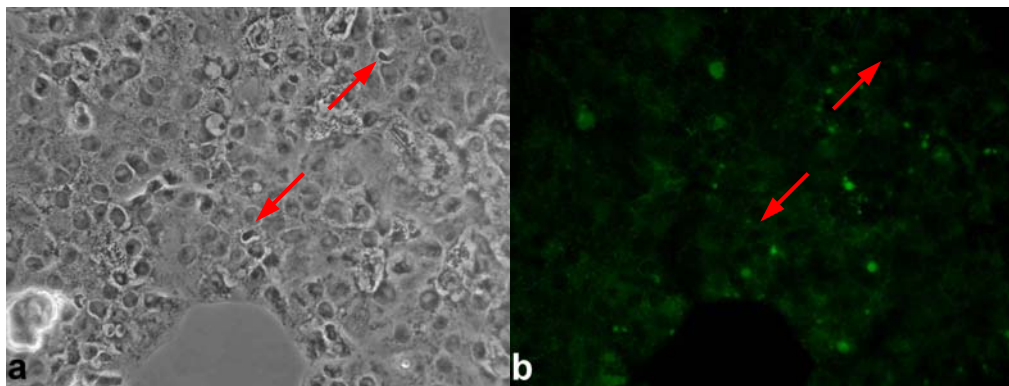


Abbildung 13: Cell Wound Assay mit VERO-Zellen bei Infektion mit *E. bovis*-Sporozoiten. a) Im Phasenkontrastbild sind 2 *E. bovis*-Sporozoiten (rote Pfeile) zu sehen. b) Das Fluoreszenzbild weist keine Dextran-positiven Zellen auf.

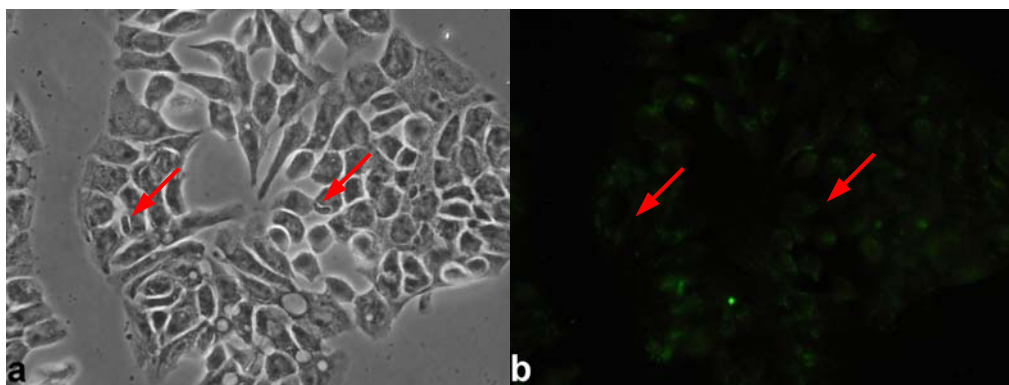


Abbildung 14: Cell Wound Assay mit HT29-Zellen bei Infektion mit *E. bovis*-Sporozoiten. a) Im Phasenkontrastbild sind 2 Sporozoiten (rote Pfeile) zu sehen b) Das Fluoreszenzbild zeigt keine Dextran-positiven Zellen.

Der Cell Wound Assay führte bei ca. 3 % der Endothelzellen (BSLEC oder BAEC) während der Infektion mit Sporozoiten von *E. bovis* zur Anfärbung: $3,39 \pm 0,29$ % der BSLEC und $2,72 \pm 0,84$ % der BAEC wiesen nach der Infektion mit Sporozoiten von *E. bovis* eine Fluoreszenz auf (Abbildung 15). Der Unterschied zu nicht infizierten Zellen war hoch signifikant; der Anteil fluoreszierender Zellen in den nicht infizierten Kontrollen lag für diese beiden Zelllinien bei 0 %. Im Gegensatz zu den Endothelzellen blieben die VERO-Zellen und HT29-Zellen während der Infektion offensichtlich unversehrt: In infizierten HT29-Kulturen zeigten sich mit $0,06 \pm 0,03$ % genauso viele Zellen Dextran-positiv, wie in nicht infizierten Kulturen. In infizierten VERO-Kulturen lag der Anteil Dextran-positiver Zellen bei 0,03 %, gegenüber 0,04 % in nicht infizierten Kontrollzellen (Abbildung 15).

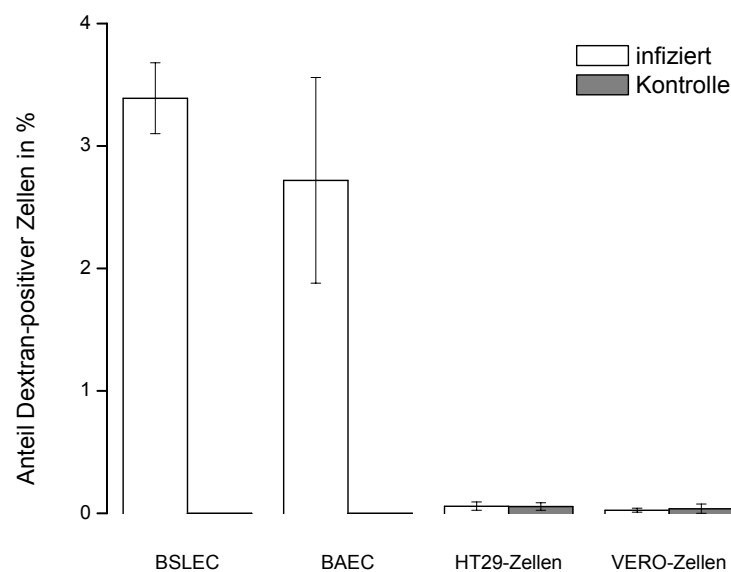


Abbildung 15: Prozentualer Anteil der Dextran-positiven Zellen im „Cell Wound Assay“. Die Grafik zeigt den prozentualen Anteil Dextran-positiver Zellen in verschiedenen Zelltypen nach Infektion mit *E. bovis*-Sporozoiten. Bei *E. bovis*-infizierten BSLEC und BAEC ist der Anteil Dextran-positiver Zellen gegenüber den nicht infizierten Kontrollzellen deutlich erhöht. Dagegen war bei HT29- und VERO-Zellen keine erhöhte Anzahl Dextran-positiver Zellen nach Infektion mit *E. bovis* zu beobachten.

Bei Betrachtung der einzelnen Bildausschnitte fiel auf, dass mit steigender Anzahl von *E. bovis*-Sporozoiten in einem Bildausschnitt auch die Anzahl Dextran-positiver BSLEC

(Abbildung 16) bzw. BAEC (Abbildung 17) im selben Bildausschnitt anstieg. Abbildung 18 zeigt das Verhältnis der Dextran-positiven Zellen zu den *E. bovis*-Sporozoiten für die 4 verschiedenen Typen von Wirtszellen. Das Verhältnis Dextran-positiver Endothelzellen zur Anzahl der Sporozoiten lag dabei jeweils knapp unter 1 ($0,91 \pm 0,08$ bei BSLEC, $n = 123$ und $0,95 \pm 0,23$ bei BAEC, $n = 14$). Bei VERO-Zellen lag dieser Quotient bei $0,04 \pm 0,03$. ($n = 77$) und bei HT29-Zellen bei $0,17 \pm 0,1$ ($n = 32$). Dass dieser Wert (Dextran-positiver Zellen/Parasit) bei *E. bovis* infizierten HT29 Zellen mit 0,17 deutlich größer war als bei den VERO-Zellen, war nicht auf die Verletzung der Zellmembran durch Parasiten zurückzuführen. Der relativ hohe Wert kam dadurch zustande, dass die Anzahl Dextran-positiver Zellen schon in den Negativkontrollen relativ hoch und die Infektionsrate (also die Anzahl intrazellulärer Parasiten) sehr niedrig war. Der Anteil Dextran-positiver Zellen ist bei den infizierten Zellen nicht höher als bei den Kontrollen (vergleiche Abbildung 15).

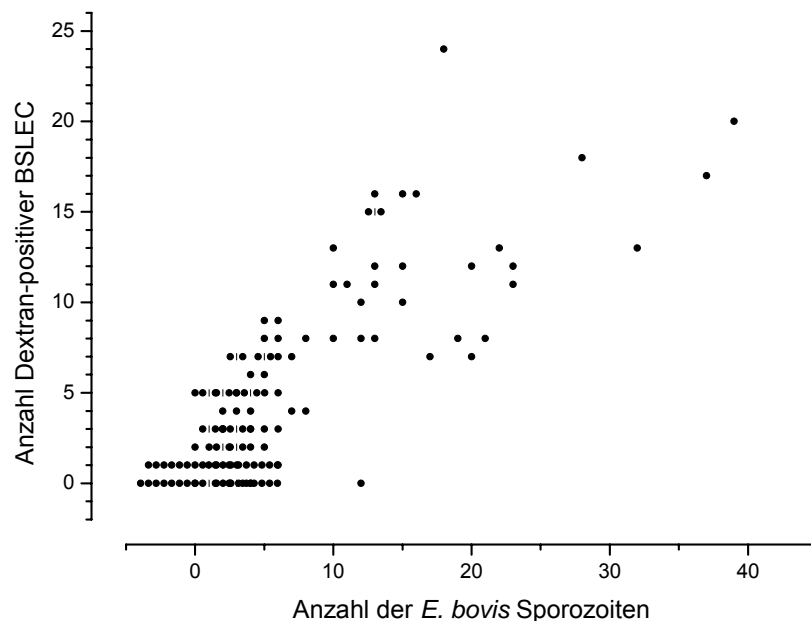


Abbildung 16: Anzahl der Dextran-positiven BSLEC aufgetragen gegen die Anzahl der intrazellulären *E. bovis*-Sporozoiten. Die Anzahl der Dextran-positiven BSLEC steigt mit der Anzahl der *E. bovis*-Sporozoiten.

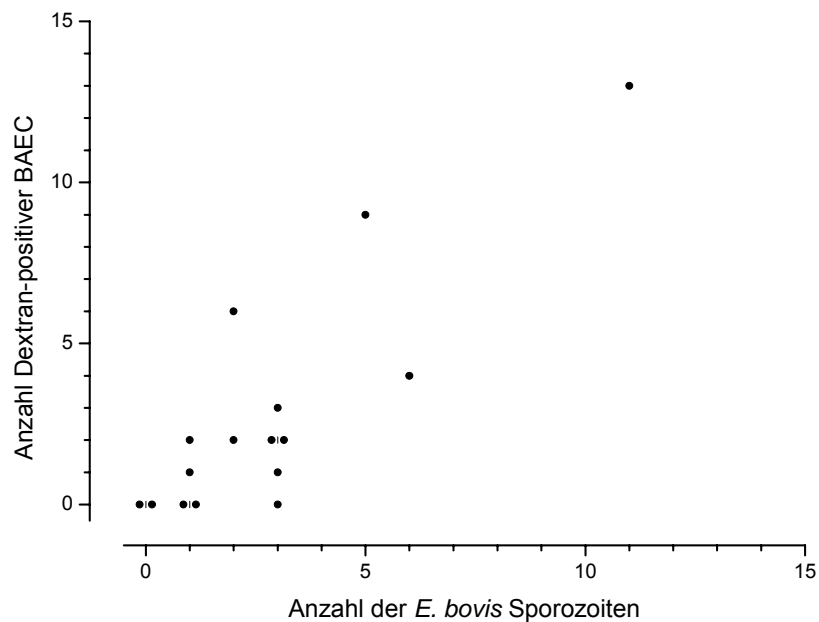


Abbildung 17: Anzahl der Dextran-positiven BAEC aufgetragen gegen die Anzahl der intrazellulären *E. bovis*-Sporozoiten. Die Anzahl Dextran-positiver BAEC steigt mit der Anzahl der *E. bovis*-Sporozoiten

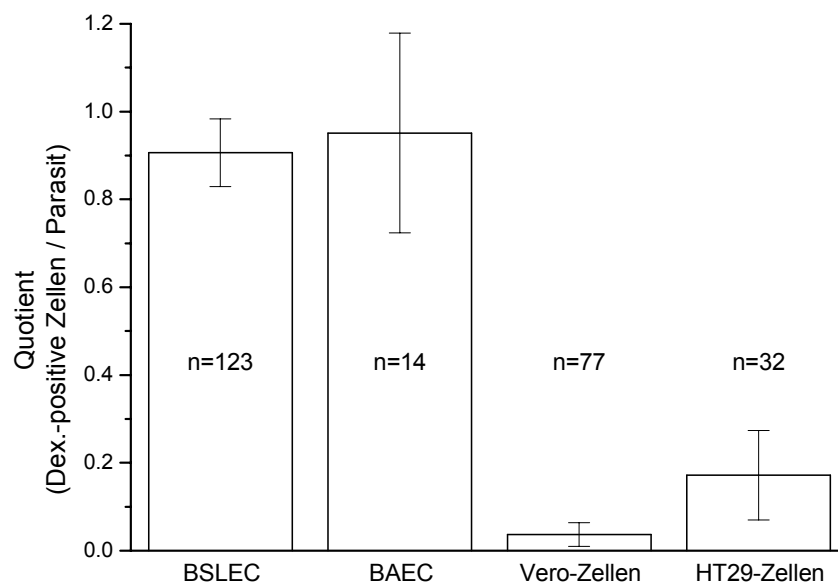


Abbildung 18: Verhältnis Dextran-positiver Zellen zur Anzahl der intrazellulären Parasiten bei verschiedenen Wirtszellen. Bei den BSLEC und BAEC war pro Sporozoit etwa eine Dextran-positive Zelle zu finden ($0,91 \pm 0,08$ bei BSLEC, $n = 123$ und $0,95 \pm 0,23$ bei BAEC, $n = 14$).

3.2.3 Mechanismus der Zellinvasion bei Tachyzoiten von *T. gondii* und *N. caninum*

In der Literatur gibt es einige Hinweise auf einen alternativen Mechanismus der Invasion für Sporozoiten verschiedener Kokzidien (besprochen in Mota und Rodriguez, 2001), jedoch keine Hinweise für solchen bei anderen Stadien im Entwicklungszyklus der Kokzidien. Um Anhaltspunkte zu sammeln, ob dieser Mechanismus den Sporozoiten vorbehalten ist, wurde getestet, ob Infektionen der BSLEC mit Tachyzoiten der verwandten Parasiten *T. gondii* und *N. caninum* auch Verletzungen der Zellmembran verursachen.

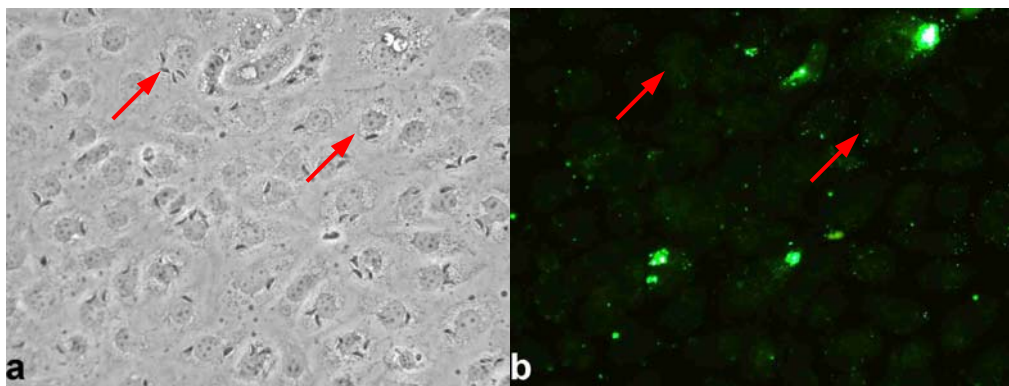


Abbildung 19: Cell Wound Assay mit BSLEC bei Infektion mit *T. gondii*-Tachyzoiten. a) Im Phasenkontrastbild sind viele, zum Teil mehrfach infizierte BSLEC zu erkennen. Der linke Pfeil weist auf eine Zelle mit 4 intrazellulären Tachyzoiten, der rechte Pfeil auf eine einfach infizierte Zelle. b) Das Fluoreszenzbild zeigt keine Dextran-positiven BSLEC. Die hell fluoreszierenden Stellen repräsentieren keine Dextran-positiven Zellen, sondern einen unspezifischen Niederschlag des Fluorochroms.

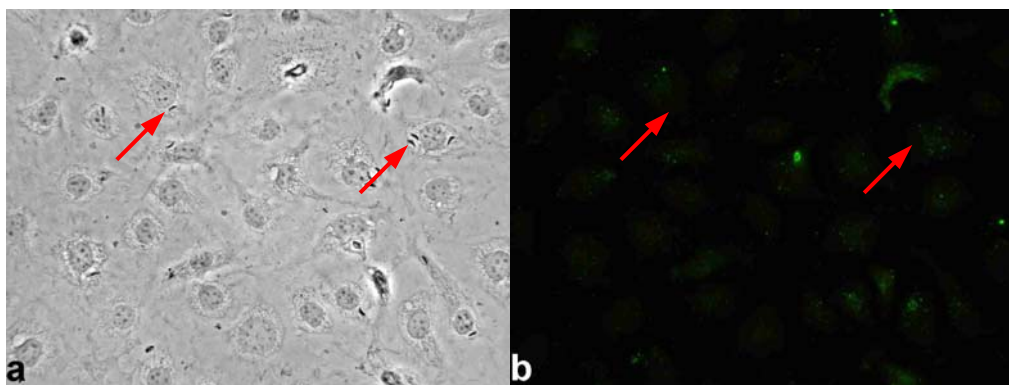


Abbildung 20: Cell Wound Assay mit BSLEC bei Infektion mit *N. caninum*-Tachyzoiten. a) Das Phasenkontrastbild zeigt infizierte BCLEC. Auch hier sind mehrfach infizierte Wirtszellen zu beobachten. Der linke Pfeil zeigt auf einen einzelnen intrazellulären Tachyzoiten, die ebenfalls mit einem Pfeil markierte Zelle rechts ist mit 3 Tachyzoiten infiziert. b) Das Fluoreszenzbild zeigt keine Dextran-positiven BSLEC.

Beide Parasiten drangen schnell in BAEC- bzw. BSLEC ein. Dies geschah aber offensichtlich ausschließlich ohne Perforation der Zellmembran, denn nach Infektion von BAEC und BSLEC mit Tachyzoiten von *N. caninum* oder *T. gondii* konnte selbst bei sehr hohen Infektionsraten von 20 - 30 % keine Färbung der Endothelzellen beobachtet werden. (Abbildung 19 und Abbildung 20). Die Tachyzoiten verletzten also beim Eindringen in die Wirtszelle deren Zellmembran nicht.

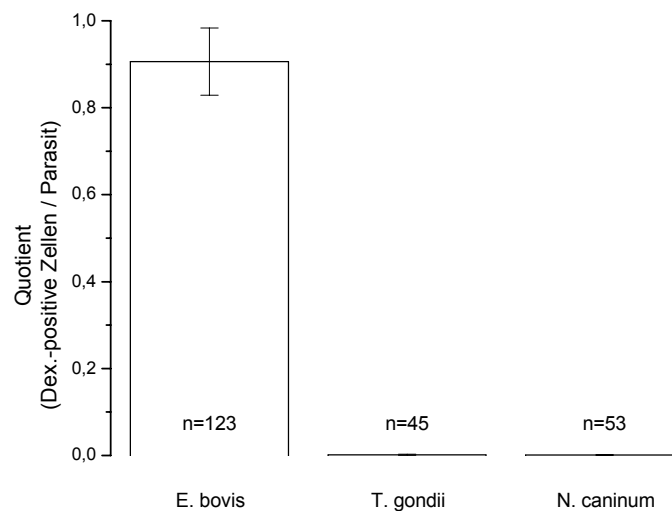


Abbildung 21: Verhältnis Dextran-positiver Zellen zur Anzahl der Parasiten bei BSLEC, die mit *E. bovis*-Sporozoiten, *N. caninum*-Tachyzoiten oder *T. gondii*-Tachyzoiten infiziert worden waren. Bei Infektion mit *E. bovis* ist die Anzahl gefärbter BSLEC in einem Bildausschnitt fast genauso hoch wie die Anzahl der darin nachgewiesenen Sporozoiten. Der Quotient beträgt $0,91 \pm 0,08$. Bei Infektion mit Tachyzoiten von *T. gondii* oder *N. caninum* sind keine Dextran-positiven Zellen zu finden.

3.3 Die parasitophore Vakuole *E. bovis*-infizierter VERO-Zellen

Die parasitophore Vakuole (PV) ist ein vom Wirtszellzytoplasma abgegrenztes Kompartiment, in welchem sich der Parasit innerhalb der Wirtszelle entwickelt und vermehrt. Kenntnisse über Struktur und Milieu der PV sind wesentlich zum Verständnis von Persistenz und Entwicklung des Parasiten in der Wirtszelle. Die Untersuchung des Milieus der PV ist ausgesprochen schwierig, da der Raum zwischen der Zellmembran des Parasiten und der Membran der PV (PVM) sehr klein und daher nur sehr schwer

zugänglich für Untersuchungen ist. Im Zellkultursystem VERO-Zellen/*E. bovis* entsteht eine außerordentlich große PV, welche Untersuchungen dieses Kompartimentes mit der Laser-Konfokalmikroskopie ermöglicht. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen wurden der pH-Wert und die $[Ca^{2+}]$ in verschiedenen Kompartimenten infizierter Zellen, sowie die Permeabilität der begrenzenden Membranen untersucht.

3.3.1 Permeabilität der Membranen von Parasit und parasitophorer Vakuole

Der Einsatz des pH-sensitiven Farbstoffs Carboxy-SNARF diente nicht nur der Bestimmung des pH-Wertes. Über die Betrachtung der Farbstoffkonzentration in den verschiedenen Kompartimenten liefern die Fluoreszenzbilder auch Informationen zur Permeabilität intrazellulärer Membranen. Die Inkubation *E. bovis*-infizierter VERO-Zellen mit Carboxy-SNARF-AM 24 Stunden nach Infektion führte zu einer starken Fluoreszenz in Parasit- und Wirtszellzytoplasma, wohingegen die Fluoreszenzintensitäten in der PV bei beiden Emissionswellenlängen ($\lambda_1 = 540 \pm 15$ nm und $\lambda_2 = 680 \pm 16$ nm) deutlich geringer ausfielen. Die Fluoreszenz innerhalb der PV war jedoch immer noch signifikant höher als die Hintergrundfluoreszenz und stieg auch noch nach Beendigung der Inkubation der Zellen mit dem Farbstoff weiter an. Abbildung 22 zeigt die Fluoreszenzintensitäten bei $\lambda_1 = 540 \pm 15$ nm in einer mit Carboxy-SNARF beladenen, infizierten VERO-Zelle.

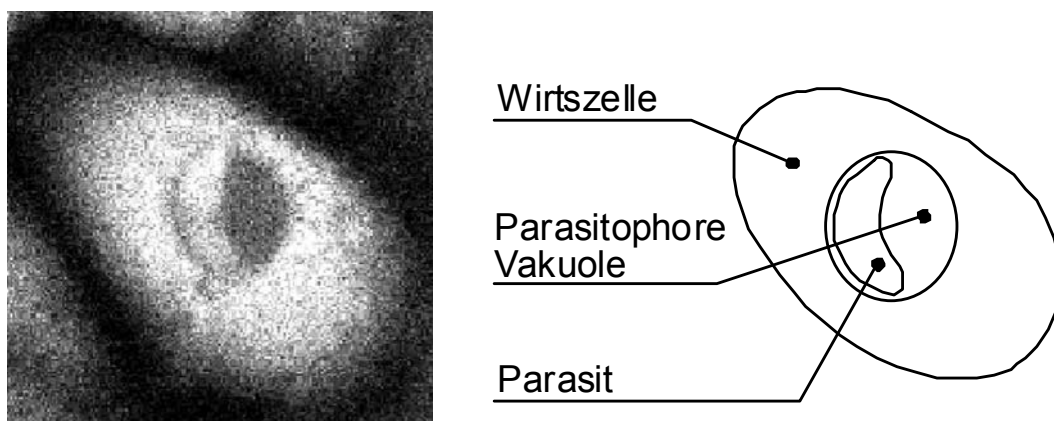


Abbildung 22: Farbstoffverteilung (Carboxy-SNARF) in einer infizierten VERO-Zelle. Die Zelle wurde 24 h nach der Infektion mit *E. bovis*-Sporozoiten mit Carboxy-SNARF beladen. Das Bild zeigt die Fluoreszenzintensität ($\lambda_1 = 540 \pm 15$ nm) in den verschiedenen Kompartimenten. Das Zytoplasma von Parasit und Wirtszelle fluoresziert stark. Die Fluoreszenzintensität der PV ist niedrig aber immer noch deutlich höher als die des Hintergrunds.

3.3.2 pH-Werte in verschiedenen Kompartimenten *E. bovis*-infizierter VERO-Zellen

Die Messung der pH-Werte sollte zeigen, ob eine Infektion mit *E. bovis* einen Einfluss auf die pH-Regulation der Wirtszelle hat. Vergleichende pH-Messungen in nicht infizierten und infizierten VERO-Zellen wurden 24 bzw. 48 Stunden nach Infektion durchgeführt. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Zeitpunkten, so dass diese Daten zusammengefasst wurden. Die in Abbildung 23 dargestellten Ergebnisse enthalten die Messwerte beider Zeitpunkte. Die zytosolischen pH-Werte nicht infizierter Kontrollzellen (pH_K) und infizierter Wirtszellen (pH_W) unterschieden sich nicht ($\text{pH}_K = 7,38 \pm 0,06$, $n = 30$ und $\text{pH}_W = 7,37 \pm 0,05$, $n = 10$). In den infizierten Zellen war der pH-Wert im Zytosol des Parasiten (pH_P) und in der parasitophoren Vakuole (pH_V) signifikant niedriger als im Zytoplasma der Wirtszelle ($\text{pH}_P = 7,19 \pm 0,04$, $n = 10$ und $\text{pH}_V = 7,17 \pm 0,06$, $n = 10$; Abbildung 23).

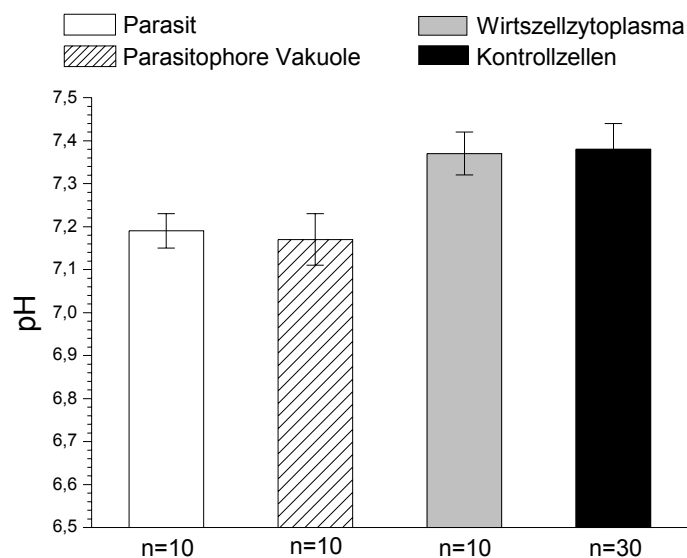


Abbildung 23: pH-Werte im Zytoplasma nicht infizierter und in verschiedenen Kompartimenten *E. bovis*-infizierter VERO-Zellen. Der zytosolische pH-Wert infizierter Zellen unterscheidet sich nicht von dem der nicht infizierten Kontrollen. In den infizierten Zellen zeigen das Zytoplasma des Parasiten und die PV einen signifikant niedrigeren pH-Wert.

3.3.3 Kalziumkonzentration in verschiedenen Kompartimenten *E. bovis*-infizierter VERO-Zellen

Der Vergleich der basalen $[Ca^{2+}]_i$ in den 3 untersuchten Kompartimenten *E. bovis*-infizierter VERO-Zellen zeigte 24 und 48 Stunden nach Infektion keinen signifikanten Unterschied. Ebenso wenig war ein Unterschied in der $[Ca^{2+}]_i$ zwischen nicht infizierten und infizierten VERO-Zellen zu erkennen (Abbildung 24).

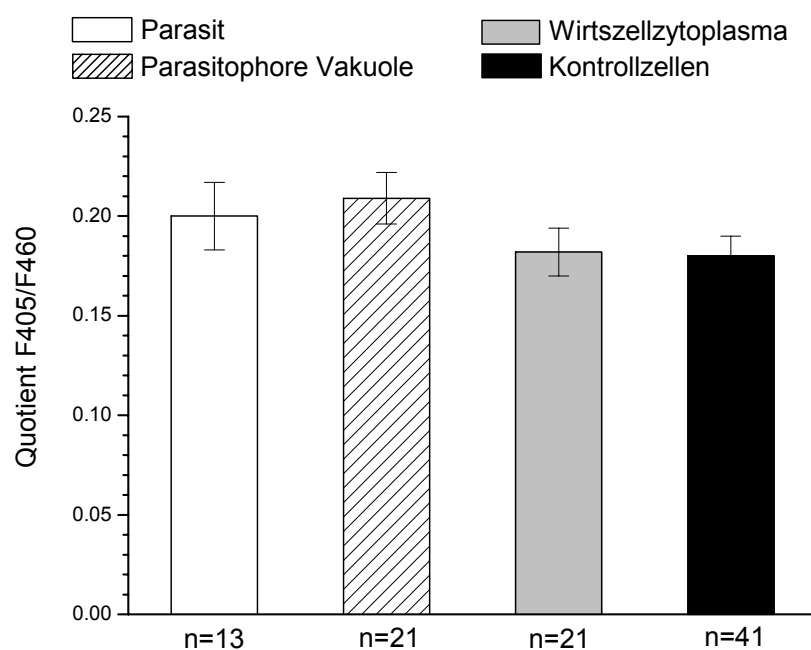


Abbildung 24: Basale $[Ca^{2+}]_i$ im Zytoplasma nicht infizierter und in verschiedenen Kompartimenten *E. bovis*-infizierter VERO-Zellen. In den mit *E. bovis* infizierten VERO-Zellen war 24 bzw. 48 Stunden nach Infektion kein Unterschied in den Kalziumkonzentrationen der 3 untersuchten Kompartimente (Wirtszellzytosol, parasitophore Vakuole und Zytoplasma des Sporozoiten) zu beobachten.

3.4 Intrazelluläre Kalziumkonzentration *Eimeria* spp.-infizierter Wirtszellen

Der Einfluss intrazellulärer Erreger auf den Kalziumhaushalt ihrer Wirtszellen ist in der Literatur an verschiedenen Beispielen beschrieben worden. Mit Hilfe des kalziumsensitiven Farbstoffes Indo 1 wurde hier untersucht, wie sich eine Eimerieninfektion auf

den Kalziumhaushalt der Wirtszelle auswirkt. Dabei wurde neben der basalen $[Ca^{2+}]_i$ auch das Kalziumsignal nach Stimulation mit einem extrazellulären Liganden untersucht.

3.4.1 Kalziummessungen mit Indo-1 – Probleme des optischen Systems bei gleichzeitiger Messung der Fluoreszenzintensitäten F405 und F460

Während der Kalziummessungen an infizierten BSLEC stellte sich heraus, dass am verwendeten Konfokalmikroskop die Fokusebenen für die beiden Fluoreszenzintensitäten F405 und F460 voneinander verschieden waren. Bei einer Messreihe, bei der die Zellen schrittweise von unten nach oben durch die Fokusebene bewegt wurden, machte sich das durch die unterschiedliche Lage der Fluoreszenzmaxima bei $\lambda_1 = 405$ nm und $\lambda_2 = 460$ nm bemerkbar (Abbildung 25).

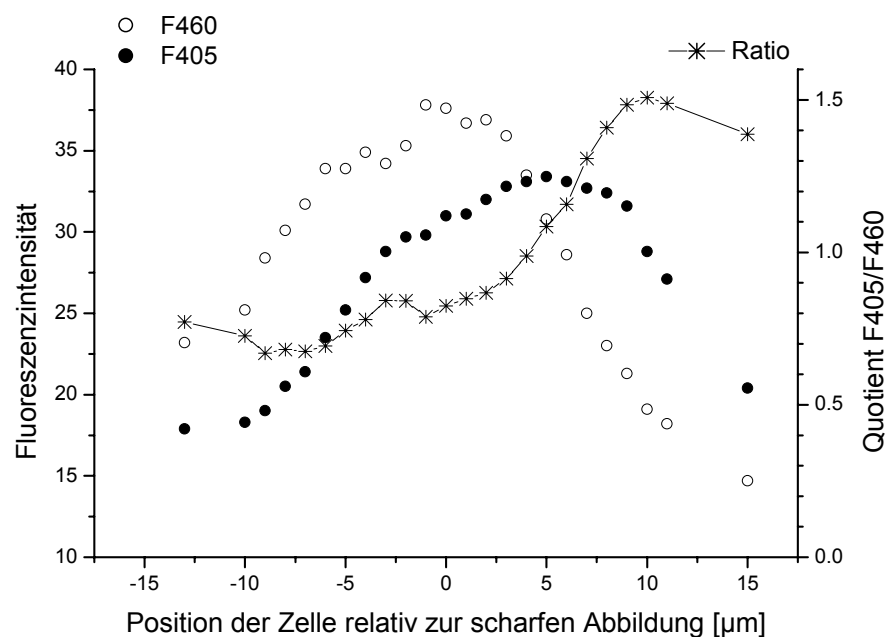


Abbildung 25: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten F405 und F460 sowie deren Quotient (F405:F460) von der Fokusebene. Das Beispiel zeigt die Fluoreszenzintensitäten und das F405:F460-Verhältnis bei einem vertikalen Scan durch eine BSLEC Zelle. Der Objektstisch mit den Zellen wurde dabei schrittweise senkrecht von unten nach oben durch die Fokusebene bewegt, wobei für jede Position die Fluoreszenzintensität bei beiden Wellenlängen gemessen wurde. In Position 0 waren die Zellen im Lichtmikroskop scharf abgebildet, was der Fokuseinstellung entsprach bei der gewöhnlich die Fluoreszenz gemessen wurde. Bei den anderen Positionen lag die untersuchte Zelle entweder unterhalb (negativ) oder oberhalb (positiv) der scharfen Abbildungsebene. Die Abbildung zeigt eine Erhöhung des Quotienten F405:F460, wenn die Zelle aus dieser Ebene heraus nach oben verschoben wird.

Die beiden Fluoreszenzintensitäten stiegen bis zu einem Maximum an, wobei der Höchstwert bei F405 deutlich vor dem bei F460 erreicht wurde. Die Differenz betrug ca. 5 μm . Wenn man eine gleichmäßige Verteilung der Kalziumionen von basal nach apikal innerhalb der Zelle annimmt, ist davon auszugehen, dass der Fokus für F405 ca. 5 μm oberhalb dessen für F460 liegt. Dieser Befund wurde bei einer Wartung des Konfokalmikroskopes durch einen Techniker der Firma BioRad bestätigt; der Fehler konnte aber nicht beseitigt werden.

Für die sehr flachen Endothelzellen resultierte daraus eine Abhängigkeit des ermittelten Quotienten F405:F460 von der Fokusebene. Der Einfluss dieses Fehlers auf den Quotienten (das heißt auf die gemessene $[\text{Ca}^{2+}]_i$) ist im obigen Beispiel (Abbildung 25) zu sehen. Wenn die Zellen aus der ursprünglichen Lage (0 μm) nach apikal (positive Werte) verschoben wurden, erhöhte sich dabei der Quotient. Bei der Verschiebung der Zelle im obigen Beispiel aus der Ursprungslage um 6 μm nach oben änderte er sich um fast 60 % von 0,82 auf 1,3.

Für die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse ist daher folgendes zu beachten: Für Zellen, die in der gleichen Fokusebene liegen, ist der beschriebene Fehler gleich groß. Unter der Annahme, dass alle in einer Messung untersuchten Zellen in der gleichen Ebene liegen, ist ein Vergleich zwischen den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dieser Zellen unkritisch.

Sobald für einen weiteren Versuch ein neues Präparat auf dem Objektisch montiert wurde, wurde die Fokusebene neu eingestellt. Die geringfügigen Unterschiede in der Lage der Fokusebene führten dann zu Unterschieden im ermittelten F405:F460-Verhältnis. Der Vergleich der Kalziumkonzentration zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen war nur deshalb möglich, weil während einer Messung gleichzeitig die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ infizierter und nicht infizierter Zellen gemessen wurde. Für die statistische Auswertung wurde jeweils auf die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der nicht infizierten Zellen normiert.

Problematisch wurde dieser optische Fehler bei Messungen am 8. Tag nach der Infektion, wenn sich der intrazelluläre Parasit im Trophozoitenstadium befand. Aufgrund des Parasitenwachstums hoben sich infizierte Zellen dann aus dem Zellrasen heraus (vgl. Abbildung 2, Seite 8). Während alle anderen Zellen genau im Fokus lagen, lag die infizierte Zelle oberhalb der Fokusebene, was eine Erhöhung des Quotienten F405:F460

zur Folge hatte, der nicht auf einer höheren $[Ca^{2+}]_i$ beruhte. Vor diesem Hintergrund ist der erhöhte Wert in infizierten BSLEC 8 dpi (Abbildung 26) nicht als tatsächliche Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, sondern als Artefakt zu deuten.

3.4.2 Basale $[Ca^{2+}]_i$ in *E. bovis*-infizierten BSLEC

Bei $[Ca^{2+}]_i$ Messungen am Tage der Infektion fiel immer wieder auf, dass nach dem Beladen der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff vermehrt freie Sporozoitien zu beobachten waren. Offensichtlich führte die Färbeprozedur in diesem frühen Stadium des intrazellulären Parasiten zu dessen Egress aus der Wirtszelle. Die hier untersuchten infizierten BSLEC am Tage der Infektion (0 dpi) sind allerdings nur solche, bei denen der Prozess der Färbung nicht zum Egress des Parasiten geführt hat.

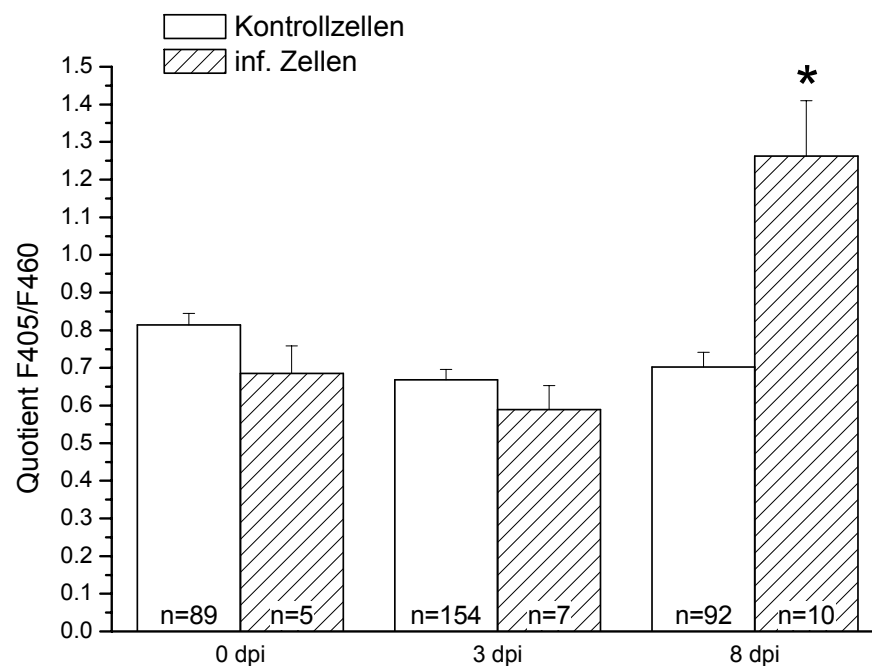


Abbildung 26: Basale intrazelluläre Kalziumkonzentration in nicht infizierten und in mit *E. bovis* infizierten BSLEC. Dargestellt ist die basale $[Ca^{2+}]_i$ am Tage der Infektion sowie 3 bzw. 8 Tage nach Infektion. Der signifikant (*) erhöhte Quotient in infizierten Zellen 8 Tage nach Infektion spiegelt **nicht** eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ wider (vgl. 3.4.1).

Die Untersuchungen der $[Ca^{2+}]_i$ der Wirtszellen (BSLEC) im Verlauf der Entwicklung von *E. bovis* vom Sporozoiten zum Schizonten erbrachten keine Unterschiede zwischen nicht infizierten und infizierten Zellen. Der signifikant erhöhte Wert bei infizierten BSLEC am Tag 8 nach Infektion (Abbildung 26) ist auf den bereits beschriebenen Fehler im optischen System des Konfokalmikroskopes und nicht auf eine tatsächlich Veränderung der basalen $[Ca^{2+}]_i$ zurückzuführen. Wirtszellen mit einem bereits vergrößerten Trophozoiten oder frühen Schizonten am 8. Tag nach der Infektion waren deutlich größer als die übrigen Zellen und hoben sich daher aus der Ebene des Zellrasens heraus. Der Unterschied in der Lage der Zelle gegenüber den nicht infizierten Zellen führte, wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, zu einer Fehlmessung der $[Ca^{2+}]_i$.

3.4.3 Das ATP-induzierte Ca^{2+} -Signal in BSLEC

Nachdem für die basale $[Ca^{2+}]_i$ in *E. bovis*-infizierten BSLEC keine Veränderung im Verlauf der Entwicklung festgestellt wurde, sollte im Folgenden untersucht werden, ob der intrazelluläre Parasit Einfluss auf intrazelluläre Kalziumsignale nimmt. Dazu wurde in den BSLEC durch Stimulation mit ATP ein intrazelluläres Kalziumsignal ausgelöst. ATP ist als extrazellulärer Botenstoff an der Regulation der Funktion von vaskulären Endothelzellen beteiligt. Die Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche bewirkt ein intrazelluläres Kalziumsignal, welches physiologische Vorgänge wie z. B. die Produktion und Freisetzung von Prostazyklin oder NO steuert (besprochen in Piroton et al., 1993).

Um die Reaktion der infizierten Zellen mit den nicht infizierten Kontrollzellen zu vergleichen, wurden die ermittelten $[Ca^{2+}]_i$ auf den Basalwert normiert und das Maximum der transienten $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung (Peak) sowie die anschließende anhaltend erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ (Plateau) in Prozent vom Basalwert berechnet. Zum Vergleich der Reaktion infizierter und nicht infizierter BSLEC auf extrazellulär zugegebenes ATP (100 μ M) wurden die Peak- und Plateauwerte der Kalziumantwort in Prozent vom Basalwert bestimmt (Basalwert = 100 %).

3.4.3.1 Charakterisierung der $[Ca^{2+}]_i$ in BSLEC nach Stimulation mit ATP

Nach Stimulation mit ATP zeigte sich typischerweise ein biphasischer Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Abbildung 27). Von einem stabilen Basalwert vor Stimulation stieg die $[Ca^{2+}]_i$ nach Gabe

von ATP zu einem Spitzenwert an und fiel dann auf einen dauerhaften, gegenüber dem Basalwert erhöhten Wert ab. Am Beispiel anderer epithelialer oder endothelialer Zelllinien hat sich gezeigt, dass die $[Ca^{2+}]_i$ nach dem Auswaschen des extrazellulären ATP auf den Ausgangswert (Basalwert) zurückkehrt (Weintraub et al., 1992; Nitschke et al., 1993; Hug et al., 1996). Für die hier durchgeführten Versuche am Konfokalmikroskop stand jedoch keine Durchflusskammer zur Verfügung, so dass eine einmal in die Messkammer eingebrachte Substanz nicht mehr ausgewaschen werden konnte. Das ATP verblieb daher bis zum Ende der Messung in der extrazellulären Lösung, weshalb auch die $[Ca^{2+}]_i$ auf dem erhöhten Niveau verblieb (Abbildung 27).

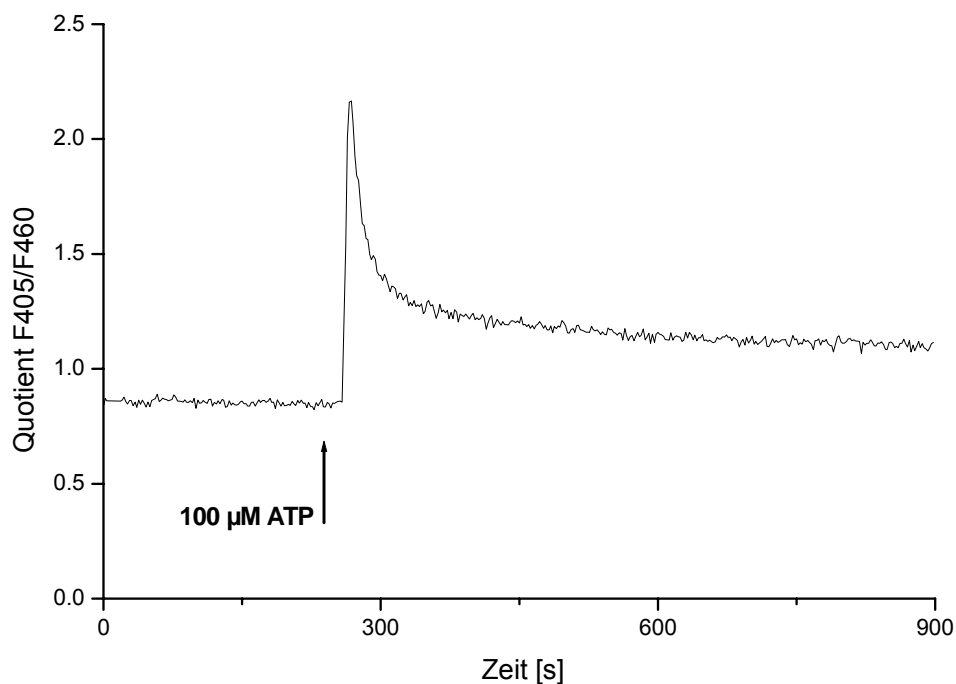


Abbildung 27: Typischer Verlauf der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in BSLEC nach Stimulation mit ATP. Nach der Zugabe von ATP steigt die $[Ca^{2+}]_i$ schnell auf einen Spitzenwert an und fällt dann auf ein dauerhaftes, gegenüber dem Basalwert erhöhtes Niveau ab.

Zur näheren Charakterisierung des ATP-induzierten Ca^{2+} -Signals wurde die Stimulation in Ca^{2+} -freier Lösung wiederholt, um zu testen, ob der schnelle Anstieg bzw. die anhaltende Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auf den Einstrom extrazellulären Ca^{2+} zurückzuführen ist. Unter dieser Bedingung blieb nur der schnelle, kurzfristige Ca^{2+} -Anstieg erhalten; eine konstant erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ war nicht mehr zu beobachten (Abbildung 28).

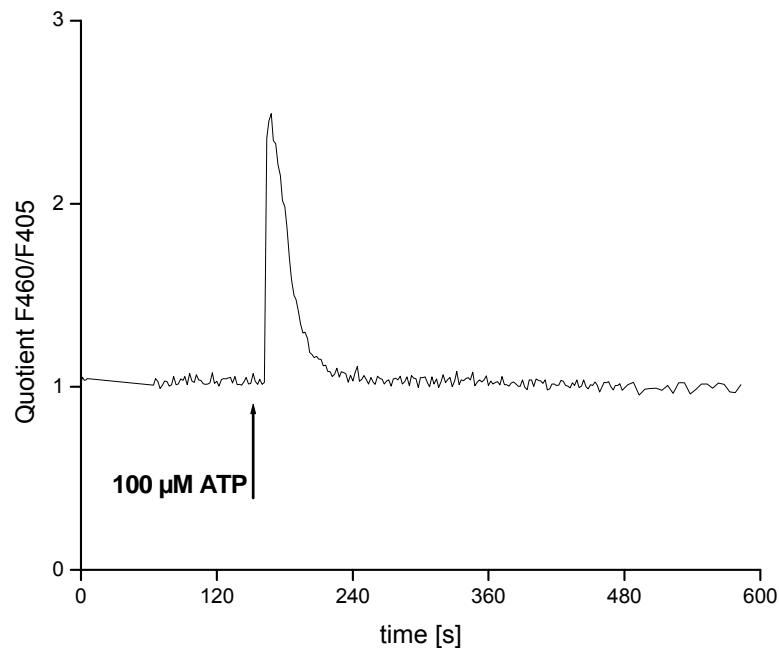


Abbildung 28: Verlauf der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in BSLEC nach Gabe von ATP bei Ca^{2+} -freien extrazellulären Bedingungen. Der schnelle Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ blieb unverändert, während das bei normalen extrazellulären Bedingungen ($2 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$) zu beobachtende leicht erhöhte Ca^{2+} -Plateau ganz ausblieb.

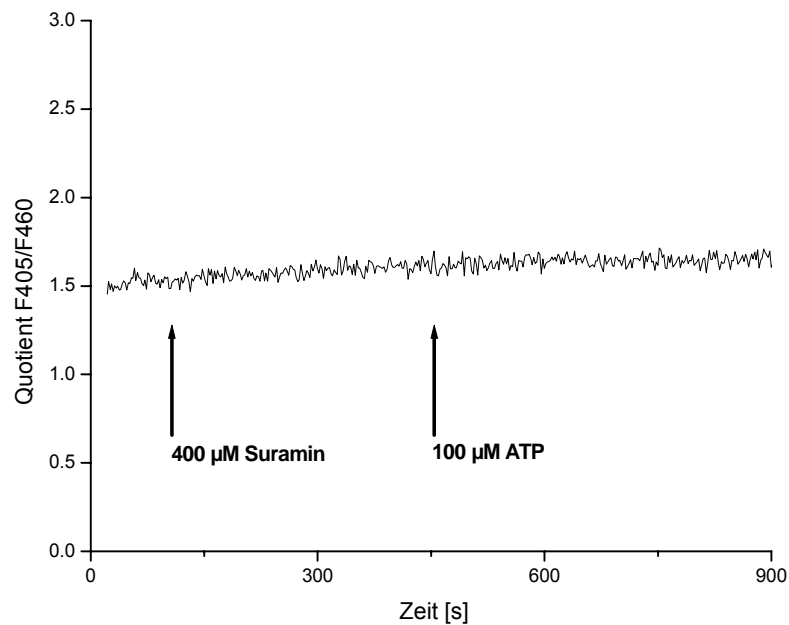


Abbildung 29: Suramin unterdrückt das durch ATP induzierte Ca^{2+} -Signal in BSLEC vollständig. Die Zugabe von Suramin alleine hat keinen direkten Einfluss auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Das Ca^{2+} -Signal in BSLEC nach Stimulation mit ATP bleibt aber mit 400 µM Suramin in der extrazellulären Lösung aus.

In weiteren Versuchen wurde ein Blocker von ATP-Rezeptoren eingesetzt. Suramin als Antagonist von Purin-P2-Rezeptoren (Übersicht in Kennedy, 1990) sollte zeigen, ob es sich bei der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach der Zugabe von ATP tatsächlich um eine rezeptorvermittelte Reaktion handelt. Die Zugabe von 400 μM Suramin zur Badlösung vor der Stimulation mit ATP verhinderte die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ vollständig (Abbildung 29).

3.4.3.2 Das ATP-induzierte Ca^{2+} -Signal in *E. bovis*-infizierten BSLEC

Ein Einfluss von *E. bovis* auf intrazelluläre Ca^{2+} -Signale der Wirtszelle (BSLEC) ließ sich nicht feststellen. Der zeitliche Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit ATP in *E. bovis* infizierten BSLEC unterschied sich nicht von dem in nicht infizierten Zellen (vgl. 3.4.3.1). Auch das Ausmaß der $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung (Peak- und Plateauwerte) zeigte keine Veränderung gegenüber nicht infizierten Zellen.

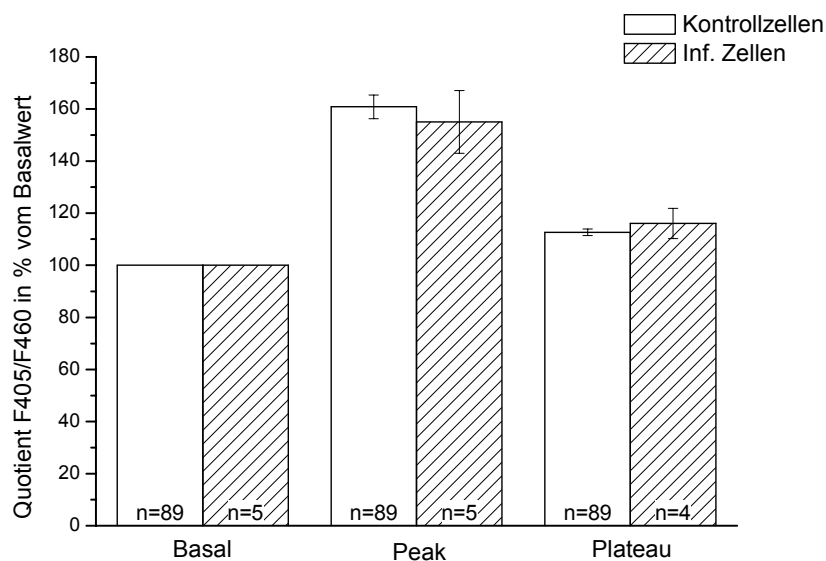


Abbildung 30: $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit ATP in *E. bovis*-infizierten BSLEC am Tage der Infektion. Die Reaktion nicht infizierter und infizierter BSLEC auf extrazellulär zugegebenes ATP (100 μM) unterscheidet sich nicht voneinander. Größe und Fehler der basalen $[Ca^{2+}]_i$ (durch die Normierung auf den Basalwert hier stets 100%) sind in Abbildung 26 dargestellt.

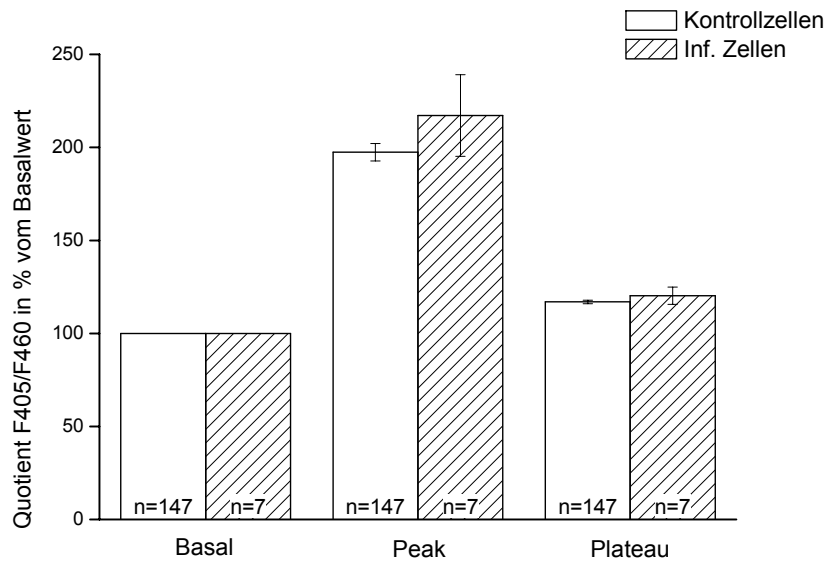


Abbildung 31: $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit ATP in *E. bovis*-infizierten BSLEC 3 Tage p. i.
Die Reaktion nicht infizierter und infizierter BSLEC auf extrazellulär zugegebenes ATP (100 μ M) unterscheidet sich nicht voneinander.

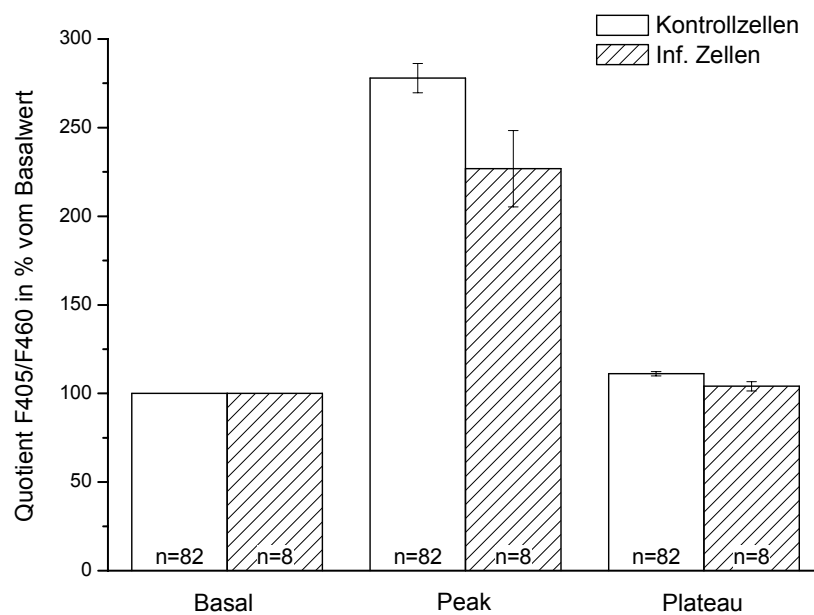


Abbildung 32: $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit ATP in *E. bovis*-infizierten BSLEC 8 Tage p. i.
Die Reaktion nicht infizierter und infizierter BSLEC auf extrazellulär zugegebenes ATP (100 μ M) unterscheidet sich nicht voneinander. Der Unterschied im „Kalziumpeak“ ist nach dem unabhängigen t-Test (Microcal Origin) nicht signifikant ($p = 0.065$). Absolutwert und Fehler der basalen Ca^{2+} -Konzentration sind in Abbildung 26 dargestellt.

Am Tage der Infektion (Abbildung 30) und 3 Tage nach der Infektion (Abbildung 31) sind die Werte für den Kalziumpeak und das Plateau fast gleich. Am 8. Tage nach der Infektion (Abbildung 32) zeigt sich ein etwas erhöhter Kalziumpeak, der jedoch nach dem unabhängigen t-Test nicht signifikant ist. „Basal“ bezeichnet die $[Ca^{2+}]_i$ in Ruhe. Da die $[Ca^{2+}]_i$ für jede Zelle auf diesen Wert normiert wurde beträgt dieser Wert stets 100 %. „Peak“ bezeichnet das Maximum der $[Ca^{2+}]_i$ während der transienten Erhöhung und „Plateau“ bezeichnet die anschließende, dauerhaft erhöhte $[Ca^{2+}]_i$.

3.4.4 $[Ca^{2+}]_i$ in *E. separata*-infizierten HT29-Zellen

Die Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ in *E. separata*-infizierten HT29-Zellen wurden 24–27 h nach Infektion durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt fanden sich bereits reife Schizonten in den Wirtszellen. Wie bei den *E. bovis*-infizierten BSLEC und VERO-Zellen war auch hier kein signifikanter Unterschied in der basalen $[Ca^{2+}]_i$ zwischen nicht infizierten und infizierten Zellen zu beobachten. Für nicht infizierte Kontrollzellen lag der Quotient F405:F460 bei $0,367 \pm 0,014$ ($n = 85$) und für infizierte bei $0,402 \pm 0,024$ ($n = 28$).

Dagegen zeigte sich nach Stimulation der *E. separata*-infizierten HT29-Zellen mit $10 \mu M$ ATP ein Unterschied zu nicht infizierten Zellen. Wie bei den BSLEC (Kapitel 3.4.3.1) kam es zu einem biphasischen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. In den infizierten Zellen war aber der „Peak“ deutlich reduziert. Der Quotient stieg bei nicht infizierten Zellen von $0,367 \pm 0,022$ (basal) auf einen Spitzenwert von $0,932 \pm 0,050$ ($n = 28$). Die infizierten Zellen zeigten hier einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ von $0,394 \pm 0,035$ auf $0,732 \pm 0,065$ ($n = 9$).

Um zu testen, ob der verminderte Ca^{2+} -Anstieg auf einen geringeren Ca^{2+} -Gehalt der intrazellulären Speicher zurückzuführen war, wurde der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach Entleerung dieser Speicher durch Thapsigargin ($1 \mu M$) beobachtet. Thapsigargin entleert intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher durch Inhibition der Ca^{2+} -ATPase in deren Membran (Thastrup et al., 1990). Die so hervorgerufene Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in infizierten und nicht infizierten HT29-Zellen zeigte keinen signifikanten Unterschied und sprach somit gegen eine durch die Infektion verursachte Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher. Der thapsigargininduzierte Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (ΔQ) betrug $1,66 \pm 0,016$ für infizierte Zellen und $0,207 \pm 0,015$ für nicht infizierte Zellen. Auch der nachfolgende Versuch zeigte, dass

die Ursache für den reduzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit ATP nicht eine verminderte $[Ca^{2+}]$ in den intrazellulären Speichern war. Carbachol, ein Analogon des Acetylcholin erhöht ebenfalls die $[Ca^{2+}]_i$ in HT29-Zellen. Wie bei der Stimulation mit ATP erhält man auch hier einen biphasischen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Der Anstieg ist durch eine plötzliche Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern bedingt, gefolgt von einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum (Fischer et al., 1992). Nach der Gabe von Carbachol (100 μ M), kam es zu fast identischen Anstiegen der $[Ca^{2+}]_i$ in infizierten und nicht infizierten Zellen. $\Delta Q = 0,229 \pm 0,081$ für infizierte Zellen ($n = 7$) gegenüber $0,255 \pm 0,034$ für nicht infizierte Zellen ($n = 22$).

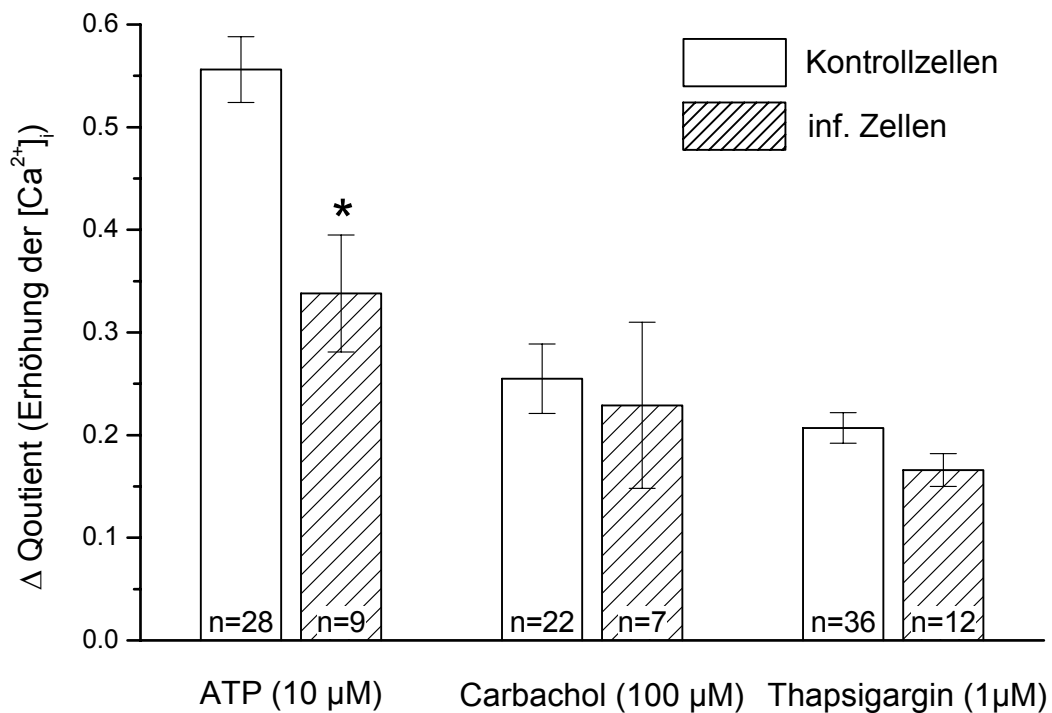


Abbildung 33: Reaktion *E. separata*-infizierter und nicht infizierter HT29-Zellen auf verschiedene Ca^{2+} -erhöhende Substanzen. Die Reaktion auf ATP ist in *E. separata*-infizierten Zellen signifikant reduziert, während sich der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach Zugabe von Carbachol nicht von dem in Kontrollzellen unterscheidet. Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ bei Entleerung der intrazellulären Speicher durch Thapsigargin zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen.

3.5 Elektrophysiologie

3.5.1 Schwierigkeiten bedingt durch die HT29/B6-Zellen

Bei den HT29/B6-Zellen handelt es sich um eine mukussezernierende Zelllinie (Kreusel et al., 1991). Der relativ zähe Schleim auf der Zelloberfläche machte das „Sealen“ so gut wie unmöglich. Der Einsatz des schleimlösenden Wirkstoffes Dithiothreitol (DTT, Lightowler und Lightowler, 1971) half, den Schleim zu entfernen. Dabei zeigten sich aber sehr schnell „Membranbläschen“ auf der Zelloberfläche und die Zellen gingen zugrunde. Auf der „freiliegenden“ Membran dieser Bläschen konnten zwar genügend hohe Abdichtwiderstände erzielt werden, länger andauernde Messungen in der „Cell-Attached“-Konfiguration oder „Whole-Cell“-Messungen waren aber in der Regel nicht durchführbar, da die Zellen rasch leck wurden oder die Bläschen sich abschnürten. Sowohl in der „Cell-Attached“-, wie auch in der „Inside-Out“-Konfiguration konnten Einzelkanalereignisse erfasst werden. Der Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zellmembran war aber meist sehr instabil, so dass die Messungen nur von kurzer Dauer waren. Ein Lösungswechsel gelang daher in der Regel nicht, so dass detektierte Kanäle nicht näher charakterisiert werden konnten. Ein Beispiel für eine Einzelkanalaufzeichnung an einem nach DTT-Behandlung an der Zellmembran entstandenem Bläschen ist in Abbildung 34 dargestellt.

Zu sehen sind Stromspuren bei Klemmspannungen von -100 bis $+100$ mV abgeleitet von einer nicht infizierten HT29/B6-Zelle in der „Cell-Attached“-Konfiguration. Einzelkanalereignisse sind bei den Klemmspannungen $+100$, $+80$, $+60$ und -60 mV zu sehen. Nach Übergang in die „Inside-Out“-Konfiguration wurde für diesen Kanal bei symmetrischen Ionenbedingungen (in mM: 130 NaCl, 10 KCl, 1,2 MgCl₂, 1,2 CaCl₂, 10 HEPES, pH 7,3) aus den Einzelkanalamplituden eine Leitfähigkeit von etwa 190 pS berechnet.

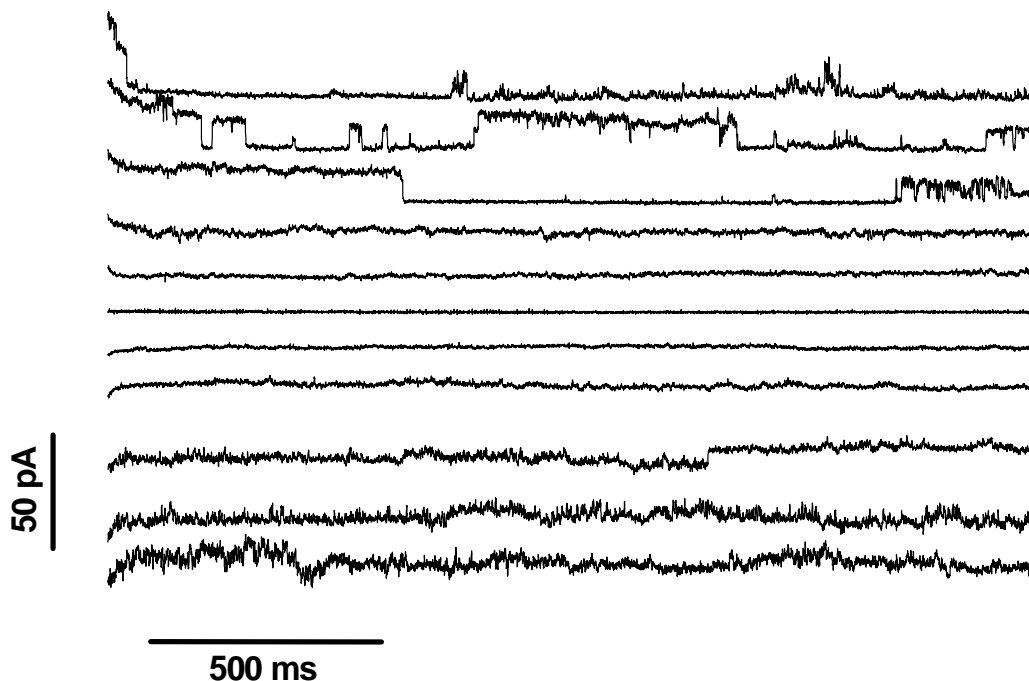


Abbildung 34: Einzelkanalaufzeichnungen an einer nicht infizierten HT29/B6-Zelle in der „Cell-Attached“-Konfiguration. Die Messung wurde durchgeführt, nachdem die Zellmembran mit Hilfe von DTT von störendem Mukus befreit wurde. Die Patchpipette wurde an einer nach DTT-Behandlung an der Zelloberfläche aufgetretenen Blase aufgesetzt. Die Klemmspannung wurde in 20 mV-Schritten von -100 mV (unterste Stromspur) bis $+100$ mV (oberste Stromspur) verändert.

3.5.2 VERO-Zellen

An den VERO-Zellen, die sich besonders gut für fluoreszenzoptische Untersuchungen an der Parasitophoren Vakuole eigneten (Kapitel 3.3), war die Erlangung eines ausreichend hohen Abdichtwiderstandes zwischen Glasmikropipette und Zellmembran nicht so schwierig wie bei den HT29-Zellen. Allerdings neigten die Zellen nach dem Übergang in die „Whole-Cell“-Konfiguration sehr stark zum „Resealing“. Das heißt, der eben durchbrochene Membranfleck unter der Öffnung der Patchpipette verschloss sich sehr schnell wieder von selbst, was die Ganzzellaufleitungen verhindert. Es gelang nicht, zuverlässig eine stabile „Whole-Cell“-Konfiguration herzustellen. Häufig brach auch der Sealwiderstand völlig zusammen, so dass weder ein Membranfleck, noch die ganze Zelle zu messen waren. Während der Bemühungen, eine Methode zur Erlangung einer stabilen

„Whole-Cell“-Konfiguration zu finden, konnten aber Einzelkanalmessungen in der „Cell-Attached“- und „Inside-Out“-Konfiguration durchgeführt werden. Dabei wurden verschiedene Kanäle in der Zellmembran von VERO-Zellen erfasst.

Abbildung 35 zeigt die registrierten Membranströme einer „Inside-Out“-Messung. Bei Klemmspannungen von -80 bis 0 mV zeigten sich deutliche Einzelkanalereignisse. Durch die Verwendung unterschiedlicher Cl^- -Konzentrationen in der Bad- und der Pipettenlösung wurde einer der detektierten Kanäle als Cl^- -Kanal identifiziert: Das Umkehrpotenzial des durch diesen Kanal fließenden Stroms wurde mit Hilfe der linearen Regression aus den Einzelkanalamplituden bei -80 bis 0 mV ermittelt und entsprach mit $30,2 \pm 4,2$ mV genau dem Gleichgewichtspotenzial für Chlorid. Bei den verwendeten Lösungen (Pipette: 100 Na-D-Glukonat, 44 KCl; Bad: 140 NaCl, 4 KCl; jeweils in mM) ergab sich nach der Nernst-Gleichung ein Chlorid-Gleichgewichtspotenzial E_{Cl^-} von 29,9 mV (bei Zimmertemperatur, 20°C). Im Bereich negativer Klemmspannungen verlief die Strom-Spannungs-Kurve linear, die Leitfähigkeit betrug 94 ± 6 pS (Abbildung 36).

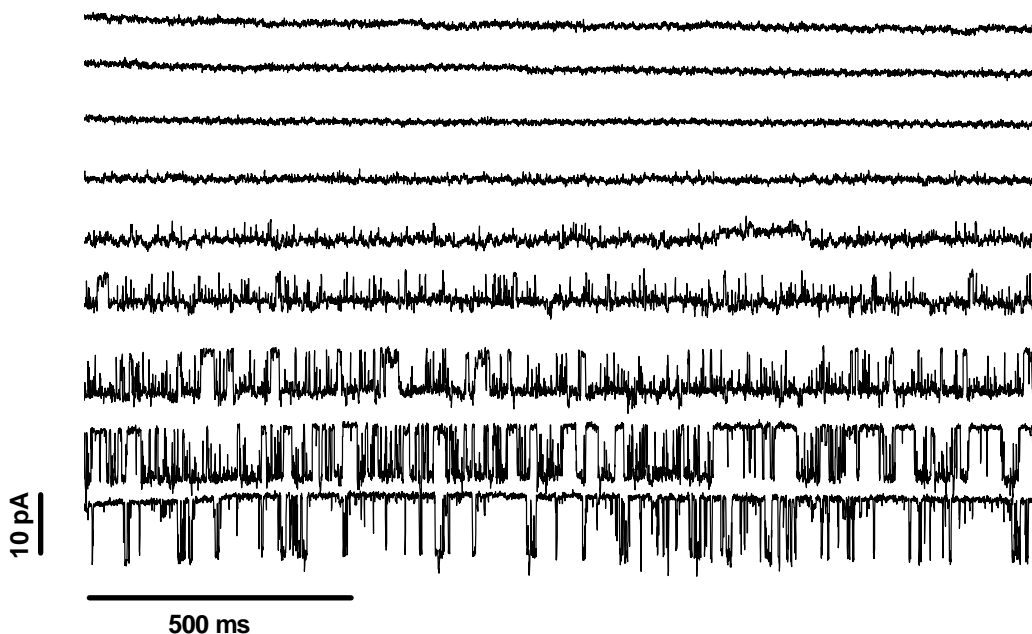


Abbildung 35: Einzelkanalaufzeichnungen an einem Membranfleck einer nicht infizierten VERO-Zelle („Inside-Out“-Konfiguration). Die Klemmspannung wurde in Schritten von 20 mV von -80 bis $+80$ mV verändert. Kanalereignisse sind nur bei Klemmspannungen im Bereich von -80 bis 0 mV zu beobachten.

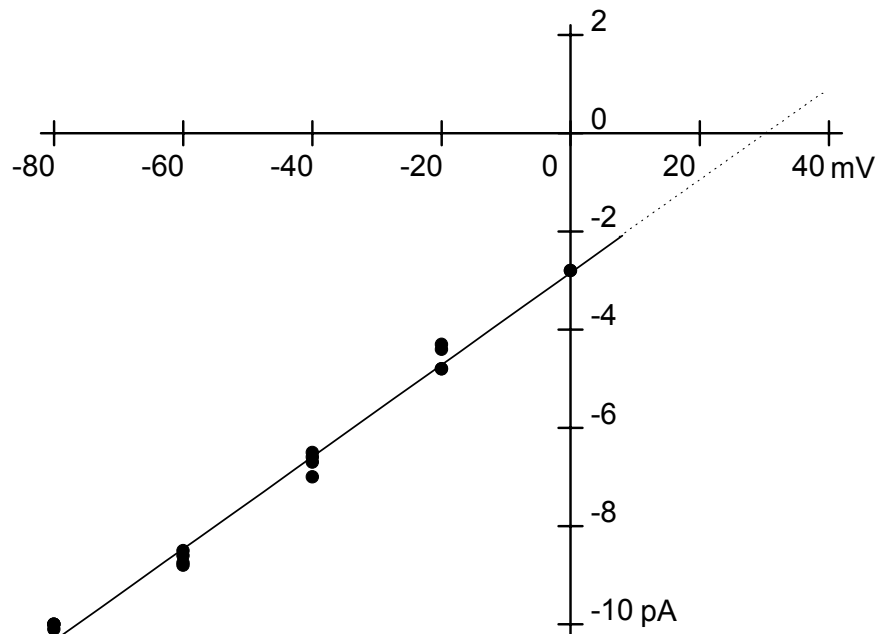


Abbildung 36: Strom-Spannungsbeziehung zwischen den Einzelkanalströmen und der anliegenden Klemmspannung. Die aus der Steigung berechnete Leitfähigkeit beträgt 94 pS. Die Verlängerung der Geraden liefert ein Umkehrpotenzial von 30,2 mV, welches sehr gut dem rechnerischen Gleichgewichtspotenzial für Cl^- (29,9 mV) entspricht.

Bei positiven Klemmspannungen waren keine Einzelkanalereignisse auszumachen. Der Gesamtstrom, der bei positiven Klemmspannungen gemessen wurde, entsprach dem Leckstrom, wie er nach dem Stromverlauf bei geschlossenem Kanal im Bereich negativer Klemmspannungen ermittelt wurde. Es floss also kein messbarer Strom durch den Kanal, wobei nicht geklärt ist, ob der Kanal dann ständig geschlossen war, oder ob die Einzelkanalamplitude bei positiver Klemmspannung so gering war, dass sie im Rauschen unterging.

Es fällt auf, dass die Verweildauer im geschlossenen Zustand bei zunehmend negativen Klemmspannungen immer länger wird. Tatsächlich zeigt die Offenwahrscheinlichkeit P_0 eine klare Abhängigkeit von der Klemmspannung (Abbildung 37).

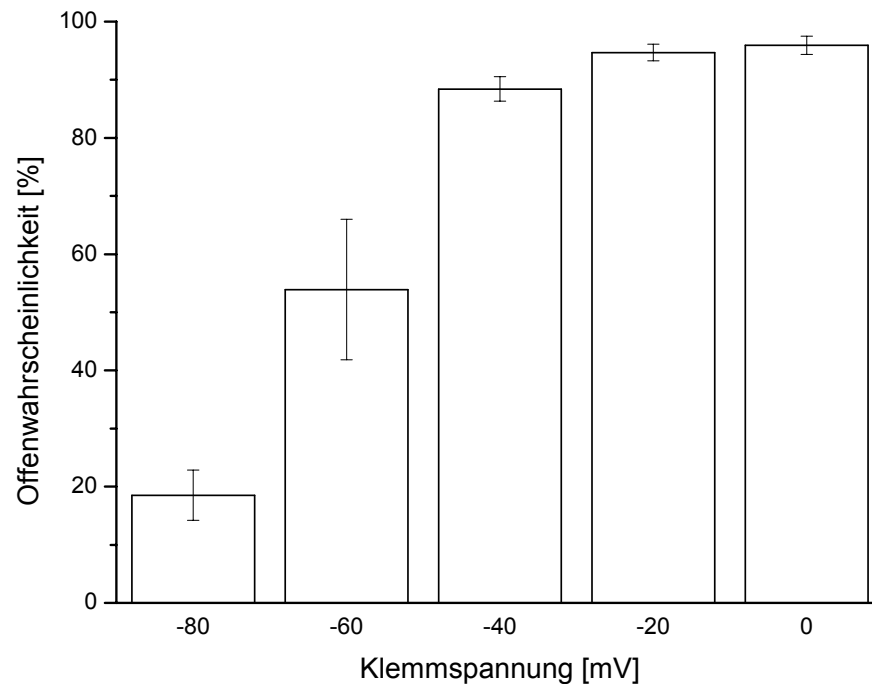


Abbildung 37: Die Offenwahrscheinlichkeit dieses Kanals zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der vorgegebenen Klemmspannung. Klemmspannungen im positiven Bereich sind hier nicht berücksichtigt, da dort keine Kanalereignisse zu erkennen waren. Mit zunehmend negativen Klemmspannungen nimmt die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals ab.

Von den VERO-Zellen existieren bislang fast keine elektrophysiologischen Daten, so dass für die Untersuchung parasitärer Einflüsse auf elektrophysiologischen Eigenschaften der Wirtszelle zunächst eine grundlegende Charakterisierung endogener Leitfähigkeiten nötig ist. Da mit dem Aufsetzen der Pipette auf eine zufällige Stelle der Zellmembran naturgemäß immer wieder unterschiedliche Kanäle „erwischt“ werden, wäre eine systematische elektrophysiologische Charakterisierung über die Analyse von Einzelkanal-daten extrem zeitaufwendig.

3.5.3 BSLEC

An nicht infizierten BSLEC gelangen sowohl Einzelkanalmessungen als auch Ganzzellableitungen. Dagegen gestaltete sich die Durchführung von Patch-Clamp-Experimenten an infizierten Zellen als schwierig. Im frühen Stadium der intrazellulären Entwicklung, in der der Sporozoit als solcher deutlich in der Zelle zu erkennen war, wurden Messungen in der

„Whole-Cell“-Konfiguration oft frühzeitig dadurch beendet, dass der Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zelle verloren ging, wenn der Parasit sich bewegte oder gar die Zelle verließ (vgl. 3.6.1). Im weiteren Verlauf der Entwicklung (Trophozoitenstadium) waren infizierte Zellen nicht eindeutig zu erkennen, da sich der Trophozoit im mikroskopischen Bild kaum von seiner Wirtszelle abhob. Nach der Trypsinbehandlung, die nötig war um die mit fortschreitender Zeit zunehmend konfluenten Zellen zu vereinzeln, waren die Trophozoiten in den abgerundeten Zellen nicht mehr zu finden. Mit Beginn des Schizontenstadiums waren infizierte Zellen wieder eindeutig zu erkennen. An diesen Zellen gelang aber ein für die Ableitung notwendiges Giga-Seal, unabhängig von der Trypsinbehandlung, in der Regel nicht. Aus den wenigen Ableitungen, die an infizierten Zellen gelangen, ergaben sich keine Hinweise auf einen Einfluss des intrazellulären Parasiten auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der BSLEC-Wirtszellen. Sowohl bei Ganzzellaufleitungen, wie auch bei Einzelkanalmessungen konnten keine Unterschiede zu den im Folgenden dargestellten Ergebnissen von nicht infizierten BSLEC festgestellt werden.

3.5.3.1 Ganzzellaufleitungen von BSLEC

Das Ruhemembranpotenzial der BSLEC zeigte sich als sehr variabel. Die Werte der untersuchten Zellen lagen zwischen -60 und -20 mV. In Abbildung 38 a ist zu sehen, dass auch die Strom-Spannungs-Beziehungen einzelner BSLEC sehr unterschiedlich sein können. Die drei dargestellten Strom-Spannungs-Kurven stammen von drei verschiedenen BSLEC, sind aber alle unter gleichen Bedingungen entstanden. Allen Zellen gemeinsam ist der auffällige, starke Einwärtsstrom bei negativen Haltepotenzialen. Bei alleiniger Betrachtung dieses steil verlaufenden, nahezu linearen Teils der Strom-Spannungs-Kurve ergibt sich ein theoretisches Umkehrpotenzial von etwa -60 bis -70 mV. Das spricht dafür, dass dieser Strom zu einem großen Teil von K^+ -Ionen getragen wird; das Gleichgewichtspotenzial für Kalium liegt unter den gegebenen Ionenverhältnissen bei -89.8 mV (das von Na^+ bei $49,1$ mV und das von Cl^- bei $37,3$ mV). Die Zugabe von Ba^{2+} ($100 \mu M BaCl_2$), blockierte diesen Strom (Abbildung 38 b).

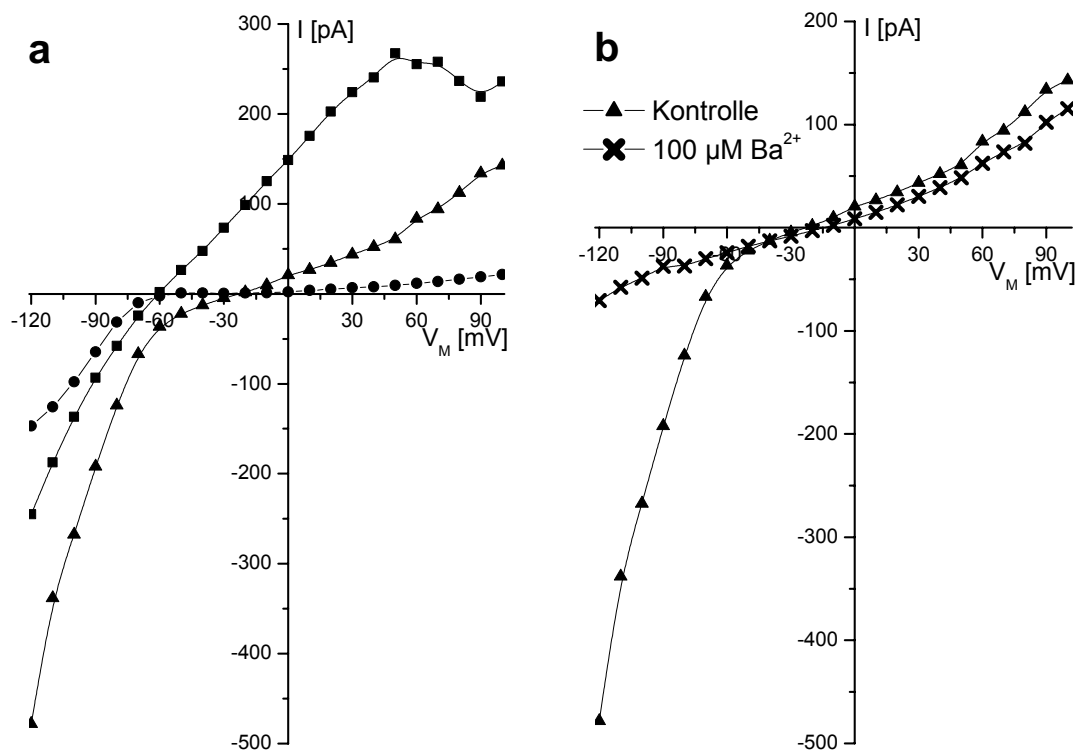


Abbildung 38: Strom-Spannungs-Beziehungen bei BSLEC. Ausgehend von einem Haltepotenzial von -60 mV wurde das Membranpotenzial in 10 mV-Schritten von -120 bis $+100$ mV verändert. Zwischen den verschiedenen Spannungspulsen, die für 400 ms anlagen, wurde für 150 ms auf das Haltepotenzial zurückgeschaltet. Die dargestellten Stromamplituden wurden jeweils am Ende des Spannungspulses gemessen. **a)** Trotz gleicher Versuchsbedingungen gab es deutliche, individuelle Unterschiede in den Strom-Spannungs-Beziehungen der BSLEC Zellen. **b)** $100 \mu\text{M BaCl}_2$ in der extrazellulären Lösung blockierten den starken Einwärtsstrom.

3.5.3.2 Einzelkanalmessungen an BSLEC

In der „Cell-Attached“- bzw. „Inside-Out“-Konfiguration konnten Einzelkanalströme von isolierten Membranflecken abgeleitet werden. Abbildung 39 zeigt ein Beispiel für eine solche Messung. Die Ionenlösungen in Pipette und Messkammer unterschieden sich dabei in ihrer Chloridkonzentration (Pipette: in mM 140 NaCl , 4 KCl , 1 MgCl_2 , 1 CaCl_2 ; Bad: in mM 30 NaCl , $110 \text{ Na-D-Glukonat}$, 4 KCl , 1 MgCl_2 , 1 CaCl_2). Ausgehend von einem Haltepotenzial von 0 mV wurde das Membranpotenzial in 20 mV Schritten für jeweils 5 Sekunden auf Werte von -80 bis $+80$ mV geklemmt (dargestellt sind jeweils nur die ersten

2 s). Zwischen den einzelnen Klemmpotenzialen wurde für 100 ms auf das Haltepotenzial von 0 mV zurückgestellt.

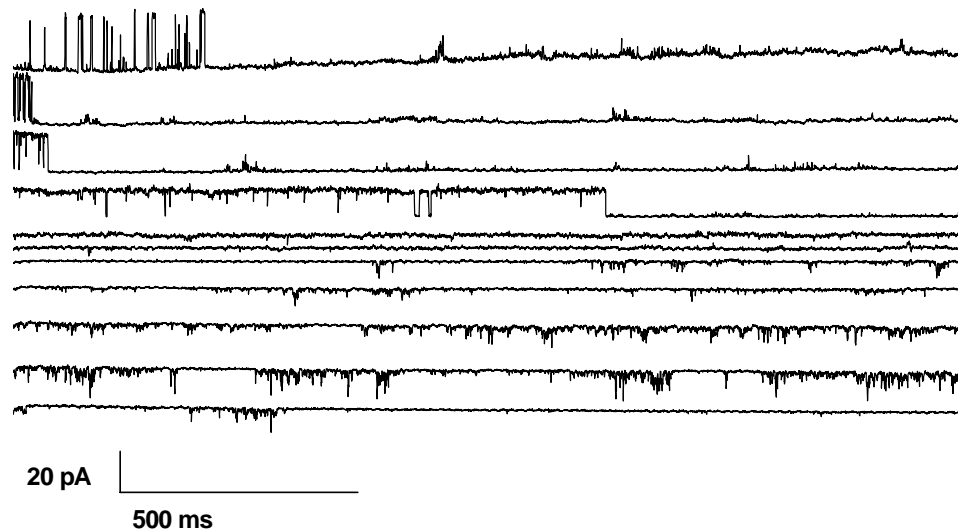


Abbildung 39: Einzelkanalströme an einem Membranfleck („Inside-Out“-Konfiguration) einer nicht infizierten BSLEC. Dargestellt sind die Membranströme bei Klemmspannungen zwischen -80 und $+80$ mV. Die $[Cl^-]$ im Bad war reduziert.

Das Umkehrpotenzial entsprach mit ca. -34 mV genau dem Gleichgewichtspotenzial von Chlorid, das nach der Nernst-Gleichung unter diesen Bedingungen $-34,3$ mV beträgt. Der Austausch der chloridreduzierten Lösung in der Messkammer gegen die „normale“ extrazelluläre Lösung, die sich auch in der Pipette befand, führte zur erwarteten Verschiebung des Umkehrpotenzials zum neuen Gleichgewichtspotenzial von Cl^- (Abbildung 40). Dass das rechnerische Gleichgewichtspotenzial (bei symmetrischen Lösungen für alle Ionen 0 mV) nicht ganz erreicht wurde, hängt vermutlich damit zusammen, dass die Lösung noch nicht vollständig ausgetauscht war. Die Leitfähigkeit dieses Kanals ist recht hoch. Außerdem ändert sie sich mit der Änderung der Chloridkonzentration. Während sie bei reduzierter Chloridkonzentration auf der Innenseite der Membran ($[Cl^-] = 38$ mM) ca. 280 pS betrug, stieg sie nach dem Wechsel auf die „normale“ extrazelluläre Lösung ($[Cl^-] = 148$ mM) auf über 340 pS.

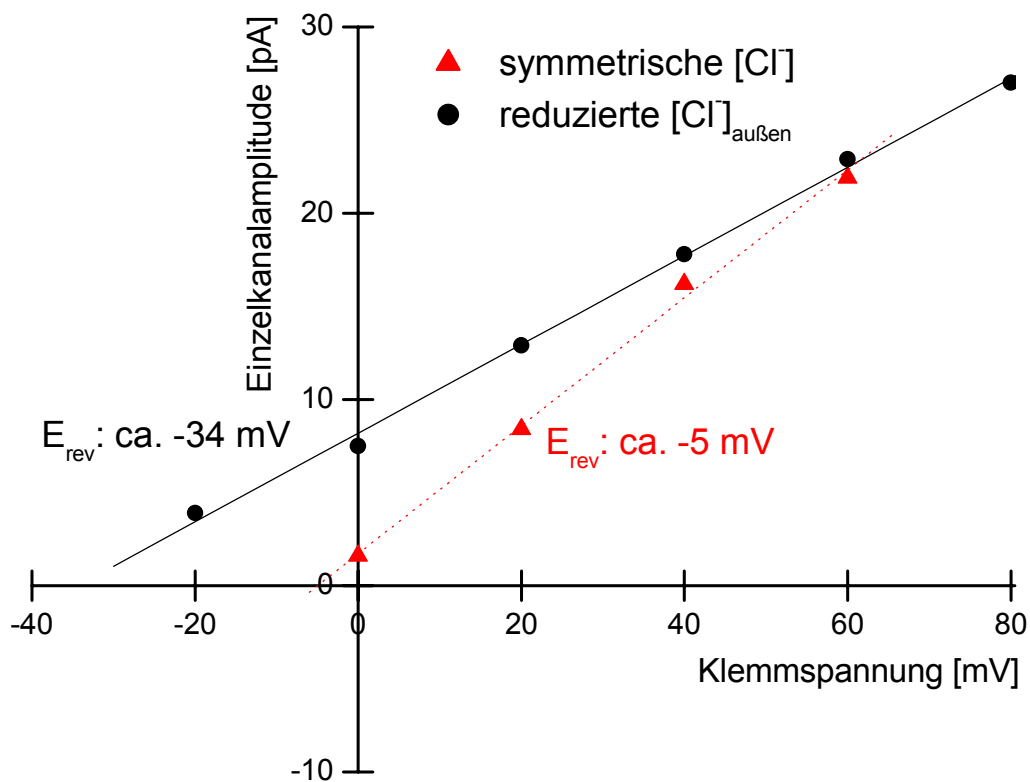


Abbildung 40: Strom-Spannungsbeziehungen der Einzelkanalströme an einer nicht infizierten BSLEC („Inside-Out“-Konfiguration) unter verschiedenen Ionenbedingungen. Das Umkehrpotenzial weist diesen Kanal als Cl^- -Kanal aus. Die Leitfähigkeit ist mit 280 bzw. 340 pS sehr groß.

3.6 Egress von Sporozoiten aus infizierten Zellen

Im Verlaufe von Patch-Clamp-Untersuchungen und beim Färben infizierter Zellen für konfokalmikroskopische Untersuchungen führte die Manipulation an den Wirtszellen immer wieder zum Egress intrazellulärer Sporozoiten.

3.6.1 Egress von Sporozoiten durch Beeinflussung der Wirtszelle bei Patch-Clamp-Experimenten

Wurde der Versuch unternommen, an frisch infizierten VERO-Zellen ein Seal herzustellen, veranlasste die mechanische Manipulation mit der Patchpipette an der Zellmembran die

E. bovis-Sporozoiten immer wieder zu Bewegungen innerhalb der PV. Schließlich führte diese Manipulation zum Egress des Parasiten aus seiner Wirtszelle (Behrendt et al., 2000). Abbildung 41 b zeigt einen Sporozoiten, der seine Wirtszelle 30 Stunden nach der Infektion verlassen hatte, nachdem diese mit einer Glasmikropipette mechanisch gereizt wurde. Anschließend bewegte sich der Sporozoit gleitend über den Zellrasen.

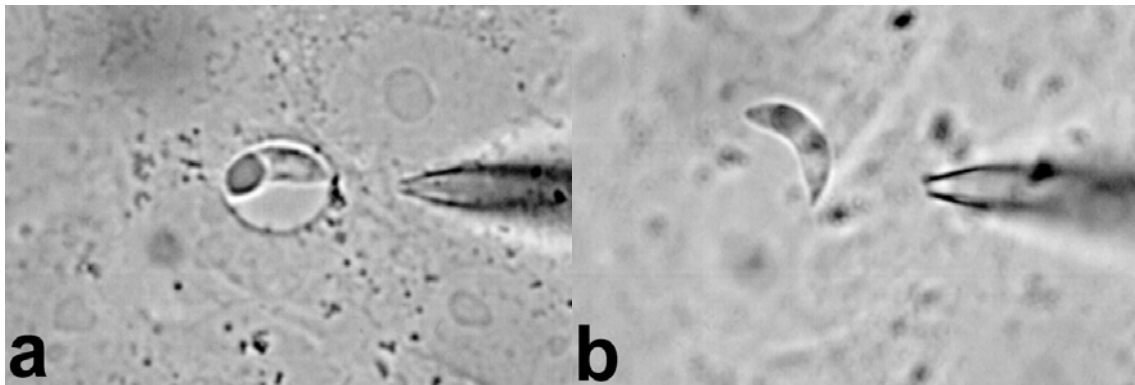


Abbildung 41: VERO-Zellen infiziert mit *E. bovis*. a) Der Sporozoit liegt innerhalb der PV, die in diesem Zellkulturmodell sehr groß und deshalb deutlich zu erkennen ist. b) Nach Manipulation mit der Mikropipette an der Wirtszelle verließ der Sporozoit diese, und drang, nachdem er eine Weile über den Zellrasen geglitten war, in eine andere VERO-Zelle ein.

Auch bei *E. bovis*-infizierten BSLEC konnte die Störung durch die Patchpipette zum Egress des Parasiten führen. Patch-Clamp-Experimente an BSLEC mit einem intrazellulären Sporozoiten endeten meist schon, bevor mit der Ableitung begonnen werden konnte. Nach erfolgreich etabliertem „Gigaseal“ endete der Versuch dann bald damit, dass der intrazelluläre Parasit die Zelle verließ, wobei auch das Seal zwischen Patchpipette und Zellmembran verloren ging. Abbildung 42 zeigt eine infizierte BSLEC, in der der Sporozoit 7 Tage nach der Infektion noch als solcher (in typischer „Bananenform“) zu erkennen war. Normalerweise verlieren die Parasiten ihre gebogene Form spätestens am 3. bis 5. Tag nach der Infektion beim Übergang in das Trophozoitenstadium. In diesem Fall schien die Entwicklung des Parasiten aber gestört. Nach Bildung eines „Gigaseals“ und anschließendem erfolgreichem Übergang in die „Whole-Cell“-Konfiguration hielt das Seal einige Minuten. Nachdem das Seal zerstört war, zeigte der erste Blick durch das Mikroskop, dass der Sporozoit seine Wirtszelle verlassen hatte und sich kreisförmig

gleitend fortbewegte, ein Verhalten wie es eigentlich für Sporozoiten in frisch infizierten Zellen typisch war.

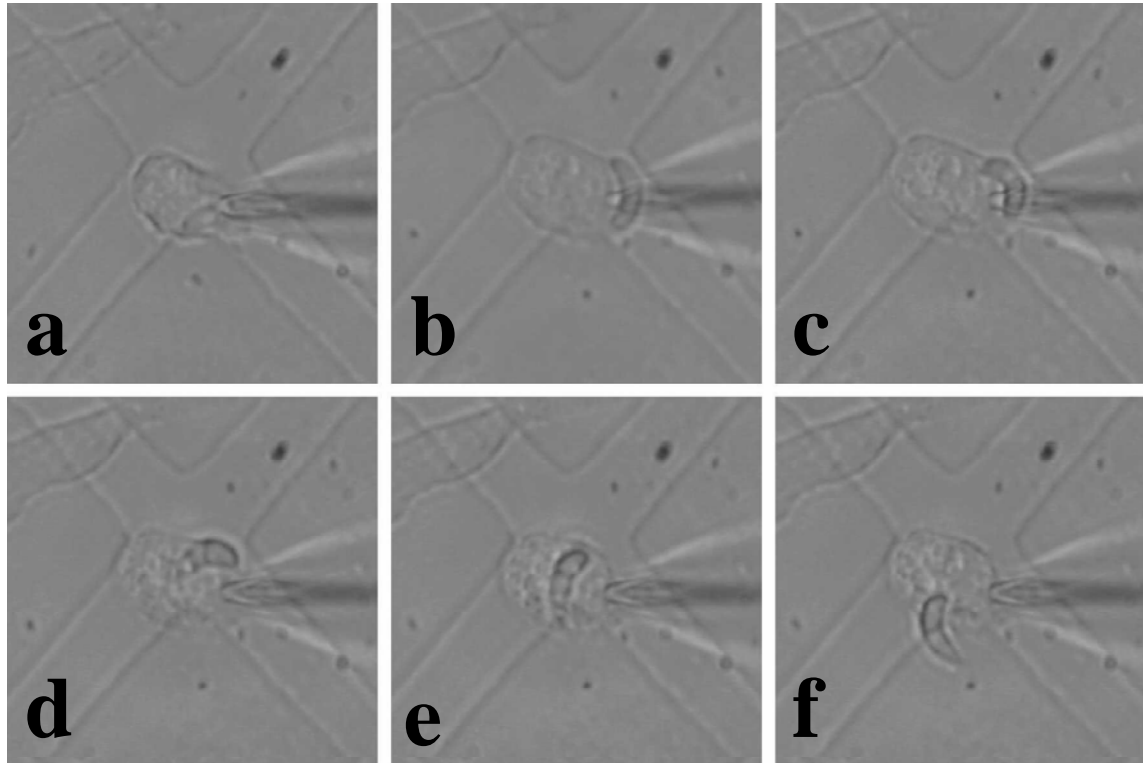


Abbildung 42: Egress eines Sporozoiten aus einer BSLEC während einer Patch-Clamp-Messung. a) Der Sporozoit liegt innerhalb der Zelle; die Patchpipette liegt bereits an der Zellmembran an. b) Nachdem das Seal zusammengebrochen war zeigte sich, dass der Parasit die Zelle verlassen hatte und sich (b-f) gleitend fortbewegte.

3.6.2 Egress von Sporozoiten durch gezielte Erhöhung der Kalziumkonzentration in der Wirtszelle

Bereits In Kapitel 3.4.2 wurde erwähnt, dass viele Parasiten am Tage der Infektion während der Färbeprozedur mit dem Farbstoff Indo 1 die Zelle verließen. Vereinzelt konnte auch beobachtet werden, dass Sporozoiten, die während der Vorbereitung der Zellen für die Ca^{2+} -Messung in der Zelle verblieben waren, nach ATP-induzierter Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auswanderten. Solch ein Fall ist in Abbildung 43 gezeigt. Die einzelnen Bilder zeigen konfokalmikroskopische Aufnahmen, die die Fluoreszenzintensität bei 405 nm (F405) Indo 1 gefärbter BSLEC wiedergeben. Der *E. bovis*-Sporozoit, der als dunkle Struktur in der Zelle zu erkennen ist (Abbildung 43, Pfeil), begann nach der ATP-

induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ innerhalb der Zelle zu wandern (a-d, Pfeile). Als der Sporozoit die Wirtszelle schließlich verließ (e), verlor diese ihre Fluoreszenz fast vollständig und war im konfokalmikroskopischen Bild kaum noch zu erkennen (f).

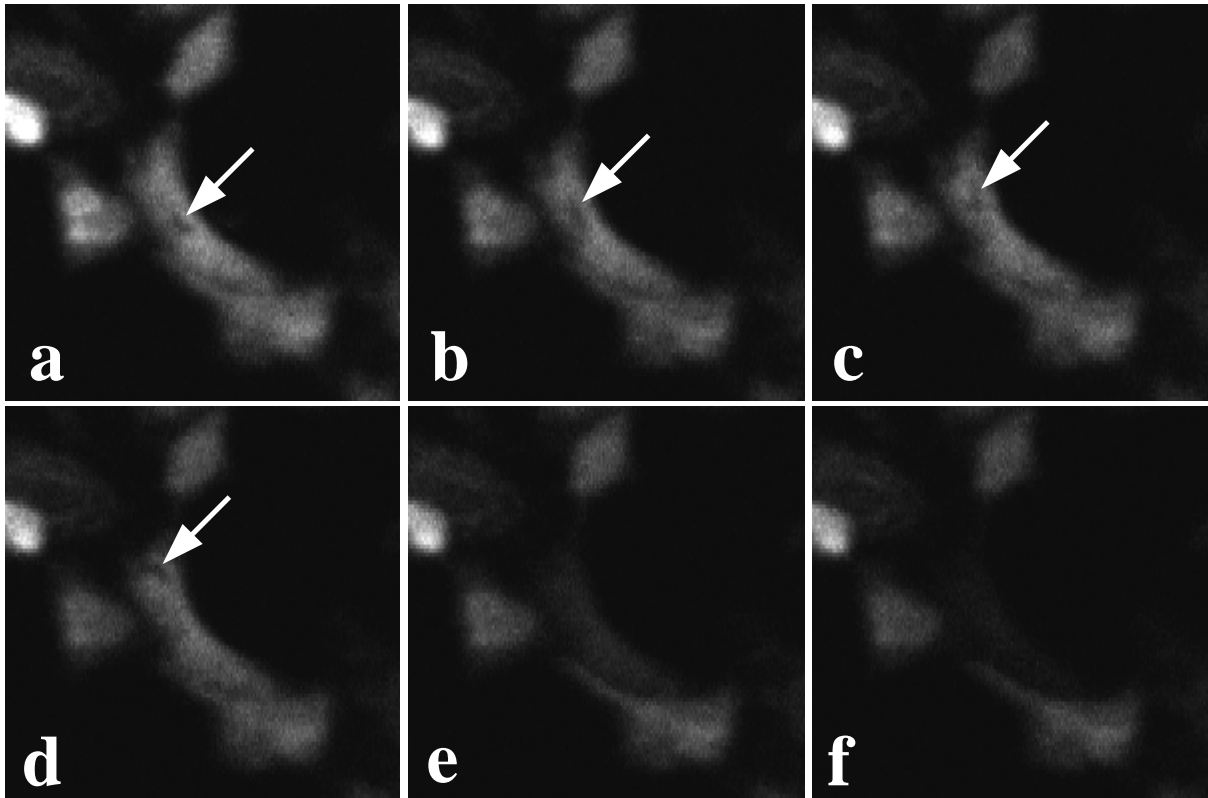


Abbildung 43: Egress eines *E. bovis*-Sporozoiten aus einer BSLEC nach einer ATP-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Dargestellt sind BSLEC am Tage der Infektion. Die konfokalmikroskopischen Bilder geben die Fluoreszenzintensität bei $\lambda_2 = 405$ nm wider. Der Pfeil markiert einen *E. bovis*-Sporozoiten, der als dunkle Struktur in seiner mit Indo 1 gefärbten Wirtszelle zu erkennen ist. Nach Stimulation der Zellen mit ATP beginnt der Parasit in der Zelle zu wandern. Schließlich verlässt er die Wirtszelle, wobei diese ihre Fluoreszenz verliert.

Bemerkenswert ist auch der Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ der infizierten und einer benachbarten nicht infizierten BSLEC nach Stimulation mit ATP. In beiden Zellen erfolgte die typische biphasische Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Während die $[Ca^{2+}]_i$ in der nicht infizierten Zelle wie üblich auf einem leicht erhöhten Niveau verblieb, stieg die $[Ca^{2+}]_i$ in der infizierten Zelle plötzlich sprunghaft sehr steil an (Abbildung 44). Dieser sprunghafte Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ deckte sich genau mit den Zeitpunkt, da der Parasit begann, aus der Zelle auszuwandern.

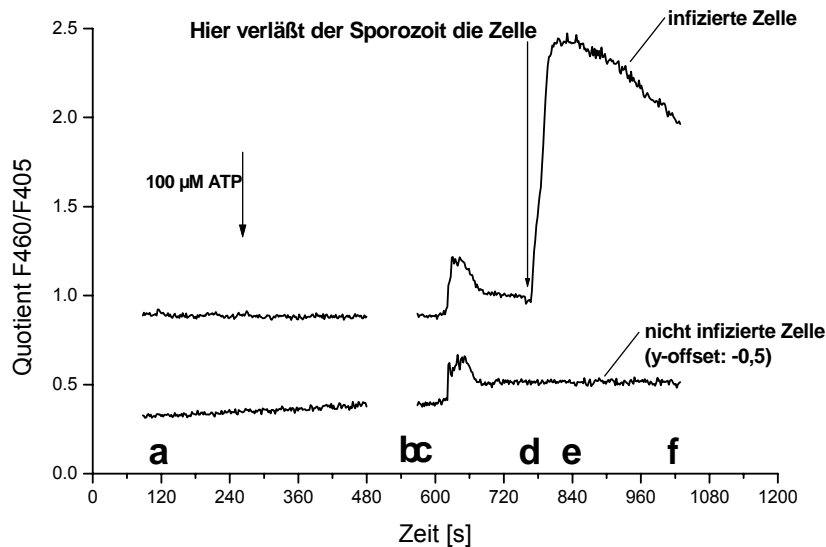


Abbildung 44: Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration in einer *E. bovis*-infizierten BSLEC bei Stimulation mit ATP und dem folgenden Egress des Sporozoiten im Vergleich mit einer nicht infizierten BSLEC. Die obere Kurve zeigt den Verlauf der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ für die infizierte Zelle, die untere Kurve zeigt den Verlauf in einer nicht infizierten, benachbarten Zelle. Damit beide Kurvenverläufe deutlich zu sehen sind, wurde die Kurve für die nicht infizierte Zelle $-0,5$ Einheiten nach unten verschoben dargestellt. Die Zeitpunkte an denen die entsprechenden Fluoreszenzbilder in Abbildung 43 aufgenommen wurden sind mit **a-f** markiert. Nach dem typischen biphasischen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stieg die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der infizierten Zelle noch einmal sehr steil an, als der Parasit die Zelle verließ.

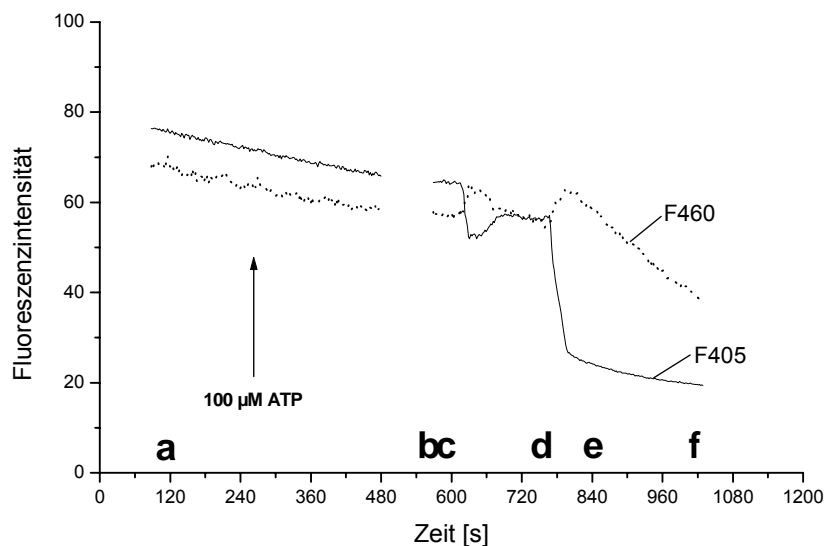


Abbildung 45: Verlauf der Fluoreszenzintensitäten $\lambda_1 = 460 \text{ nm}$ und $\lambda_2 = 405 \text{ nm}$ der infizierten BSLEC während Stimulation mit ATP und anschließendem Egress des *E. bovis*-Sporozoiten. Die Fluoreszenzintensitäten beim ersten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sind typisch für das ATP-induzierte biphasische Ca^{2+} -Signal in den BSLEC. Der zweite Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zeigt eine stärkere Veränderung der Fluoreszenzintensitäten vor allem für F405. Gleichzeitig ist eine starke dauerhafte Abnahme der Fluoreszenzintensität bei beiden Wellenlängen zu sehen. Die Zeitpunkte an denen die entsprechenden Fluoreszenzbilder (in Abbildung 43) aufgenommen wurden sind mit **a-f** markiert.

Wie für einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zu erwarten war, stieg dabei F405 an, während F460 fiel (Abbildung 45). Auffällig war dabei aber die offensichtliche Diskrepanz im Ausmaß der Fluoreszenzveränderung zwischen beiden Wellenlängen. Dem relativ moderaten Anstieg der F405 stand die sehr starke Abnahme der F460 gegenüber. Im weiteren Verlauf sieht man einen deutlichen Rückgang beider Fluoreszenzintensitäten. Während F405 bis zum Ende der Messung stetig fällt, nimmt der steile Rückgang der F460 bald ein abruptes Ende.

Der durch die Färbeprozedur hervorgerufene Egress des Parasiten fiel nur bei frisch infizierten Zellen (0 dpi) auf. Auch der ATP-induzierte Egress wurde nur am Tage der Infektion beobachtet. Schon einen Tag nach der Infektion führte die Stimulation mit ATP nicht mehr zum Egress. Für *T. gondii* wurde beschrieben, dass zu jeder Zeit in der Entwicklung des Parasiten die Mikroinjektion intrazellulären Kalziums oder die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mit einem Kalziumionophor zum Egress der Tachyzoiten führt (Stommel et al., 1997). Nachdem bei *E. bovis*-infizierten BSLEC 1 Tag p.i. oder später die ATP-vermittelte, physiologische Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nicht mehr zum Egress führte, wurde überprüft, ob eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mit Hilfe eines Kalziumionophors zu diesem Zeitpunkt noch zum Auswandern des *E. bovis*-Sporozoiten führen kann.

Zunächst wurden infizierte BSLEC mit ATP stimuliert. Nachdem über einen Zeitraum von mehr als 30 Minuten keine Reaktion zu sehen war, wurde mit dem Kalziumionophor A23187 die Zellmembran für Ca^{2+} permeabilisiert, um auf diese Weise die Kalziumkonzentration zu erhöhen. In Abbildung 46 sind 3 intrazelluläre Sporozoiten zu sehen, die nach der Stimulation der Wirtszellen mit ATP keine Reaktion gezeigt hatten, anschließend jedoch, nach der Zugabe des Kalziumionophors A23187, ihre Wirtszellen verließen.

Nach der Zugabe des Kalziumionophors A23187 (10 μ M) dauerte es nur 2,5 Minuten, bis der erste der 3 Sporozoiten begann, sich zu bewegen und schließlich die Zelle verließ. Dabei war die typische Einschnürung, die sich beim Durchtritt durch die Zellmembran vom Vorder- zum Hinterende des Sporozoiten verschiebt, deutlich zu sehen. Nach 6 Minuten und 20 Sekunden verließ der nächste Sporozoit seine Wirtszelle. Beim letzten Sporozoiten dauerte es ca. 30 Minuten, bis er begann, die Zelle zu verlassen. Nachdem er zur Hälfte aus der Zelle heraus war bewegte er sich aber nicht mehr. Auch bei den beiden

anderen Sporozoiten viel auf, dass sie nach dem Verlassen der Zelle regungslos liegen blieben, anstatt wie üblich kreisend auf dem Zellrasen zu gleiten.

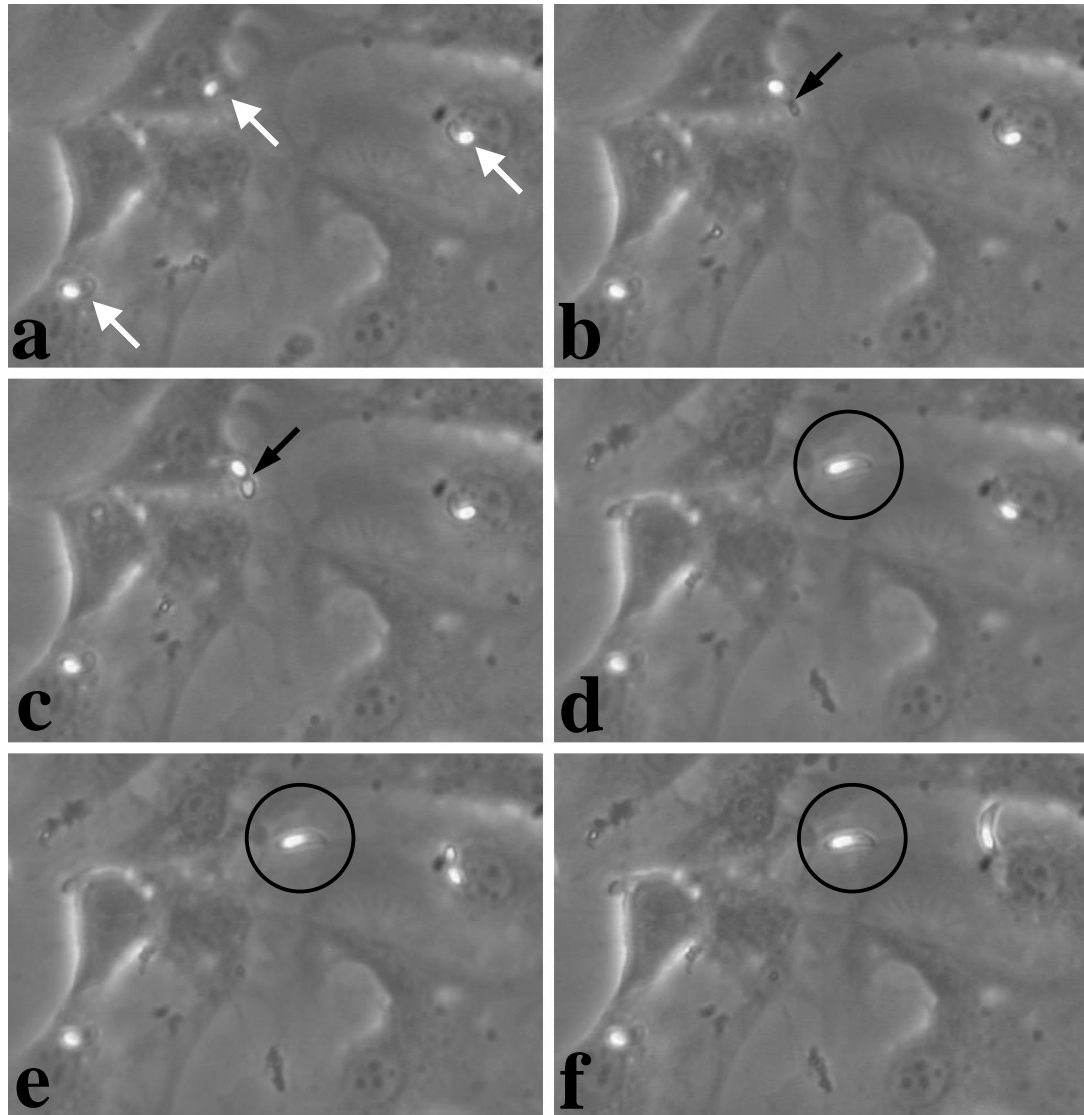


Abbildung 46: Der Egress von *E. bovis*-Sporozoiten aus BSLEC kann 1 Tag nach der Infektion durch Behandlung mit dem Kalziumionophor A23187 induziert werden. Die Permeabilisierung der Zellmembran für Kalzium mit dem Kalziumionophor A23187 führt zum Egress der Sporozoiten. Die intrazellulären Sporozoiten sind in **a** mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Beim Durchtritt durch die Zellmembran ist die typische Einschnürung des Sporozoiten zu erkennen (schwarze Pfeile in **b** und **c**). Nach dem Verlassen der Zelle verlieren die Sporozoiten schnell ihre Motilität und bleiben regungslos liegen.

3.7 Egress von *N. caninum*-Merozoiten aus reifen Schizonten

Das Auswandern der Merozoiten aus reifen Schizonten hat sich für *Sarcocystis neurona* als Ca^{2+} -abhängig erwiesen (Ellison et al., 2001). Auch dort wurde zur Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ das Kalziumionophor A23187 benutzt, wodurch in der Zellkultur die synchrone Freisetzung von Merozoiten aus reifen Schizonten erreicht wurde. Im Folgenden wurden BSLEC mit Tachyzoiten des nahe verwandten *N. caninum* infiziert. Hier zeigte sich, dass auch die durch ATP stimulierte, physiologische Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in BSLEC ausreicht, um die Merozoiten aus den reifen Schizonten freizusetzen (Abbildung 47 und Abbildung 48).

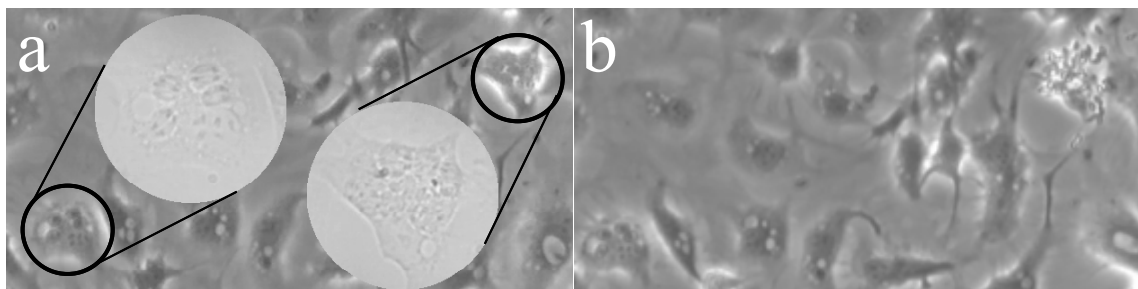


Abbildung 47: Ca^{2+} -induzierter Egress von *N. caninum* Merozoiten aus BSLEC-Wirtszellen. 2 verschieden weit fortgeschrittene intrazelluläre Stadien (in **a** vergrößert dargestellt) vor und nach der Stimulation der Wirtszellen mit ATP: Während das frühe Stadium links im Bild unverändert bleibt, führt die ATP vermittelte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beim Schizonten rechts im Bild zur Freisetzung der Merozoiten.

In *N. caninum* infizierten BSLEC in Kulturen mit sehr hohen Infektionsraten zeigte sich, dass die Stimulation mit ATP zuverlässig zum Egress der Merozoiten führt. In Abbildung 48 ist eine BSLEC-Kultur mit vielen *N. caninum*-Schizonten zu sehen. Nach der Zugabe von ATP wurden die Merozoiten freigesetzt.

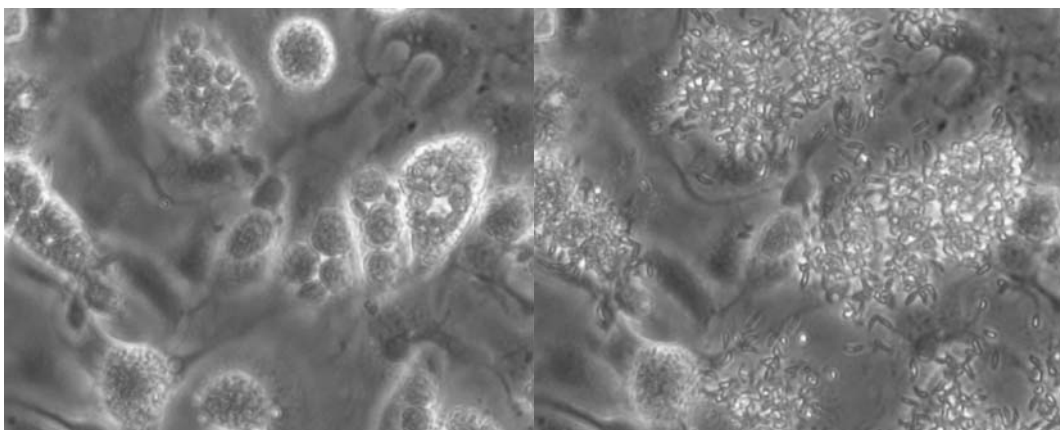


Abbildung 48: Reife Schizonten von *N. caninum* in BSLEC entlassen nach Stimulation der Wirtszellen mit ATP die Merozoiten in das umgebende Medium.

4 Diskussion

4.1 Invasion

Der im Darmlumen freigesetzte *E. bovis*-Sporozoit muss, um seine Wirtszelle, eine Endothelzelle in den zentralen Lymphkapillaren der Dünndarmvilli, zu erreichen, zumindest eine Zelllage, nämlich das Dünndarmepithel, durchqueren. Es ist unklar, auf welche Weise der Sporozoit seinen Zielort erreicht. Da das Eindringen der Kokzidien in ihre Wirtszellen ein komplexer Vorgang ist, scheint der parazelluläre Weg der einfachste zu sein. Vorgänge, die bei der Invasion der Wirtszelle ablaufen, wie z. B. die Exozytose von Mikronemen- und Rhoptrienproteinen, die Ausbildung der „moving junction“ und die Bildung der parasitophoren Vakuole blieben dem Parasiten dann erspart. Bei der Beobachtung der Invasion von *E. bovis*-Sporozoiten in Wirtszellen waren im Zellkultursystem aber immer wieder Parasiten zu sehen, die nach der Invasion die Zelle rasch wieder verließen, ohne dass die durchwanderte Zelle dabei einen sichtbaren Schaden nahm. Die Beobachtung dieses Verhaltens der Sporozoiten ist durchaus nicht neu. Schon 1967 berichteten Fayer und Hammond von *E. bovis*-Sporozoiten, die kurze Zeit nach der Invasion die Wirtszelle wieder verließen. Auch andere Arbeitsgruppen haben beobachtet, dass *Eimeria*- und *Toxoplasma*-Sporozoiten in vitro in Zellen eindringen und sie wieder verließen (Danforth et al., 1992; Chobotar et al., 1993; Speer et al., 1997). Ein entsprechender Vorgang wurde inzwischen auch für *P. yoelii*- und *P. falciparum*-Sporozoiten beschrieben, die in vitro Hepatozyten durchwanderten (Mota et al., 2001). Die Autoren haben gezeigt, dass diesem Vorgang ein alternativer Mechanismus zur Invasion der Wirtszellen zugrunde liegt. Die Sporozoiten durchbrechen bei der Invasion die Zellmembran, ohne dass eine parasitophore Vakuole gebildet wird, und verlassen die Zelle anschließend wieder. In der Regel schließt sich das Leck in der Zellmembran schnell und die Zelle überlebt diesen Vorgang. Dabei scheint dieses Durchwandern von Wirtszellen essentiell für das erfolgreiche Fortsetzen des Lebenszyklus zu sein. Erst nachdem die Sporozoiten eine Zelle durchwandert haben, verbleiben sie zur Weiterentwicklung in einer anderen Zelle, bei deren Invasion die für intrazelluläre Kokzidien typische parasitophore Vakuole gebildet wurde (Mota und Rodriguez, 2001).

Die Literatur bietet noch weitere Hinweise auf diesen alternativen Mechanismus der Invasion. Nach Nichols und O'Conner (1981) sind *T. gondii*-Sporozoiten in der Lage, bei der Invasion in Makrophagen deren Plasmamembran zu durchbrechen, um ins Zytosol zu gelangen, wo sie dann ohne umgebende parasitophore Vakuole zu finden sind. Dabei sind Überreste der durchbrochenen Membran am apikalen Ende des Parasiten zu finden. Zudem liefern weitere Berichte über Eimerien (neben Fayer und Hammond, 1967) Anhaltspunkte dafür, dass die Sporozoiten Wirtszellen durchwandern können, indem sie deren Plasmamembran durchbrechen. So konnten Danforth et al. (1984) keine Wirtszellmembran um *E. papillata*-Sporozoiten entdecken, die gerade in embryonale Gehirnzellen der Maus eingedrungen waren. In einer späteren elektronenmikroskopischen Studie zeigte sich, dass das Eindringen der *E. papillata*-Sporozoiten mit dem Aufbrechen der Zellmembran verbunden war (Danforth et al., 1992). Auch bei elektronenmikroskopischen Studien mit *E. larimerensis*-Sporozoiten zeigten sich an der Eintrittsstelle der Sporozoiten in MDBK-Zellen Unterbrechungen der Wirtszellmembran (Roberts et al., 1971).

Diese vielen Beobachtungen, die sich nicht mit dem für Kokzidien beschriebenen „klassischen“ Mechanismus der Invasion decken, waren Anlass genug, sich auch bei *E. bovis*-Sporozoiten mit dem Vorgang der Zellinvasion zu beschäftigen. Mit Hilfe des Cell Wound Assays (McNeil et al., 1999) wurde überprüft, ob *E. bovis*-Sporozoiten beim Durchwandern der Wirtszellen deren Zellmembran verletzen. Die Dextran-positiven Zellen in den Endothelzellkulturen (BSLEC und BAEC) zeigten an, dass es im Zuge der Invasion durch *E. bovis*-Sporozoiten zu Verletzungen der Zellmembran gekommen war. Da die angefärbten Zellen stets parasitenfrei waren und andererseits Zellen mit intrazellulären Sporozoiten keine Fluoreszenz zeigten, kann man davon ausgehen, dass das Dextran tatsächlich durch eine beim Durchwandern verursachte Verletzung der Zellmembran in die Zellen gelangte. Offensichtlich besitzen auch *E. bovis*-Sporozoiten einen zweiten Mechanismus zur Zellinvasion, so wie er für Plasmodien beschrieben wurde. Dieser Befund unterstützt die Ergebnisse von Mota et al. (2001), wonach die Existenz zweier unterschiedlicher Mechanismen der Zellinvasion eine plausible Erklärung für die widersprüchlichen Beobachtungen zum Infektionsmechanismus von Kokzidien bietet. Diese widersprüchlichen Beobachtungen, vor allem die Tatsache, dass immer wieder

Sporozoiten mit oder ohne parasitophore Vakuole im Zytosol der Wirtszelle zu finden sind, hatten für eine anhaltende kontroverse Diskussion gesorgt (Roberts et al., 1971; Jensen, 1975; Danforth et al., 1992; Chobotar et al., 1993).

Auch wenn Eimerien bisweilen ohne PV innerhalb einer Wirtszelle zu finden sind, so findet die Entwicklung intrazellulärer Eimerien aber typischerweise innerhalb einer PV statt (Scholtyseck und Piekarski, 1965; Entzeroth et al., 1998). Auch die Entwicklung intrazellulärer Plasmodien wurde immer innerhalb einer deutlich abgegrenzten PV beobachtet (Garnham et al., 1969; Sodeman et al., 1970; Meis et al., 1983). Bei Sporozoiten, die sich ohne PV im Zytosol einer Wirtszelle finden, könnte es sich also stets um solche handeln, die im Begriff sind, die Zelle zu durchwandern.

Es liegt nahe, die biologische Bedeutung dieses „Durchwanderns“ einer Wirtszelle in der Überwindung von Barrieren auf dem Weg zur Zielzelle zu sehen. So müssen die Sporozoiten von *Plasmodium sp.* das Endothel durchqueren um aus der Blutbahn in das Lebergewebe zu gelangen und *E. bovis*-Sporozoiten müssen auf dem Weg in das Endothel der zentralen Lymphkapillaren zunächst das Dünndarmepithel überwinden. Dementsprechend sollte man annehmen, dass Zellen, die für die Entwicklung von *E. bovis* bis zum Schizonten erster Generation nicht geeignet sind, wie VERO- und HT29-Zellen, häufiger von Sporozoiten durchwandert werden als geeignete Wirtszellen wie die bovinen Endothelzellen. Der Vergleich dieser Zelltypen im Cell Wound Assay zeigte jedoch das Gegenteil. Nur bei den bovinen Endothelzellen (BSLEC und BAEC) waren im Cell Wound Assay regelmäßig und zuverlässig angefärbte Zellen zu finden. Für VERO- und HT29-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden, dass *E. bovis*-Sporozoiten eine Verletzung der Zellmembran hervorrufen. Eine Erklärung für diesen zelltypbedingten Unterschied gibt es noch nicht. Es ist aber denkbar, dass der alternative Mechanismus der Zellinvasion bei *E. bovis* nur in Zellen auftritt, die vom Rind stammen. Während VERO-Zellen (grüne Meerkatze) und HT29-Zellen (Mensch) nicht durchwandert wurden, konnte das Phänomen nicht nur bei BSLEC und BAEC, sondern auch bei anderen bovinen Zelltypen, die hier nicht untersucht wurden, beobachtet werden (Hermosilla, persönliche Mitteilung). Die Ausweitung der Versuche auf andere bovine Zelltypen könnte in zukünftigen Untersuchungen mehr Aufschluss bringen. Von besonderem Interesse wären

hierbei vor allem Dünndarmepithelzellen, die im Falle einer Infektion die natürliche Barriere für die Sporozoiten auf dem Weg zu ihren Zielzellen, den Endothelzellen der zentralen Lymphkapillaren in den Villi der zweiten Dünndarmhälfte, darstellen. Zu einem besseren Verständnis dieses Phänomens würden auch Kenntnisse über die zu Grunde liegenden molekularen Vorgänge beitragen. Solche Daten liegen bislang jedoch noch nicht vor.

Der Nachweis des alternativen Mechanismus für *E. bovis*, *P. yoelii* und *P. falciparum*, sowie die vielen Hinweise in der Literatur auf die Existenz des Mechanismus bei anderen Eimerienarten und bei *T. gondii* deuten an, dass es sich hier um ein gemeinsames Merkmal der Kokzidien handelt. Allerdings scheint die Fähigkeit der Kokzidien, Zellen zu durchwandern, ohne eine parasitophore Vakuole zu bilden, nicht bei allen Entwicklungsstadien ausgeprägt zu sein. Die bereits erwähnten, in der Literatur zu findenden Hinweise auf diesen alternativen Mechanismus der Zellinvasion (wie z. B. das Fehlen der PV) wurden stets bei Sporozoiten beobachtet. Mota et al. (2001) konnten mit Hilfe des Cell Wound Assays zeigen, dass die Invasion von Hepatozyten durch *T. gondii*-Tachyzoiten nicht wie bei *Plasmodium*-Sporozoiten zu einer Verletzung der Wirtszellmembran führt. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte keine Verletzung der Wirtszellmembran durch Tachyzoiten nachgewiesen werden. Sowohl bei *T. gondii*- als auch bei *N. caninum*-Tachyzoiten waren keine Dextran-positiven Zellen im Cell Wound Assay mit BSLEC Zellen zu finden. Möglicherweise ist der alternative Mechanismus der Zellinvasion also auf Sporozoiten beschränkt. Das bei Ookineten von *Plasmodium* beobachtete Durchwandern der Mitteldarm-Epithelzellen ihrer *Anopheles*-Wirte scheint auf andere Weise abzulaufen. Hier führt der Vorgang zu einer erheblichen Veränderung bzw. Schädigung der befallenen Zelle, was rasch zu deren Tod führt (Zieler und Dvorak, 2000; Han et al., 2000).

Dass offenbar nur Sporozoiten die Fähigkeit besitzen, Zellen zu durchwandern, indem sie deren Zellmembran durchbrechen, mag an den unterschiedlichen Erfordernissen für unterschiedliche Parasitenstadien liegen. Die Sporozoitenstadien sind die Stadien, welche physikalische Barrieren überwinden müssen, um ihre Zielzellen zu erreichen. Die Fähigkeit der Sporozoiten, Zellen auf diese Weise zu durchwandern, könnte also eine

essentielle Voraussetzung für *E. bovis* und andere Apikomplexa sein, um die physikalischen Barrieren zu überwinden, die den Sporozoiten von seiner Zielzelle und damit von einer erfolgreichen Infektion trennen.

Es ist auch denkbar, dass zytoplasmatische Komponenten der Wirtszellen dem Parasiten als „Erkennungssignal“ dienen, so dass der Sporozoit erst nach dem Durchwandern einer möglichen Wirtszelle zur Bildung einer PV während der Invasion bereit ist. Eine weitere Bedeutung könnte im Zusammenhang mit der Immunabwehr des Wirtes stehen. Der Sporozoit könnte beim Durchwandern „Spuren“ im Zytosol hinterlassen, die zur Antigenpräsentation führen und dem Immunsystem so die falschen Zellen als „infiziert“ anzeigen.

4.2 Die parasitophore Vakuole

Für die Persistenz und die Entwicklung der Kokzidien innerhalb der Wirtszelle kommt der parasitophoren Vakuole eine zentrale Bedeutung zu. Generell erfolgt bei einer Wirtszelle die primäre Abwehr gegen ein aufgenommenes Pathogen in der Fusion von Lysosomen mit der das Pathogen enthaltenden Vakuole und der daraus resultierenden Ansäuerung. Genau das ist jedoch bei der parasitophoren Vakuole unterbunden. Schon vor ca. 30 Jahren konnte bei *Toxoplasma gondii* gezeigt werden, dass sich mehr als die Hälfte der von Makrophagen internalisierten Tachyzoiten innerhalb von Vakuolen befanden, die nicht mit Lysosomen fusionierten (Jones und Hirsch, 1972). Da die parasitophore Vakuole nicht mit anderen intrazellulären Membranen fusioniert, findet auch keine Ansäuerung wie bei den Phagolysosomen statt (Sibley et al., 1985; Joiner et al., 1990). Aus diesem und anderen Gründen ist die parasitophore Vakuole als sehr außergewöhnliches intrazelluläres Kompartiment anzusehen (Sinai und Joiner, 1997; Lingelbach und Joiner, 1998). Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen konnte in der Membran der parasitophoren Vakuole von Zellen, die mit *T. gondii*-Tachyzoiten infiziert waren, die Existenz von Poren nachgewiesen werden, die den freien Austausch von Molekülen einer Größe von bis zu 1300-1900 Da erlaubten (Schwab et al., 1994). Die Existenz von Poren in der Membran der parasitophoren Vakuole wird aufgrund elektrophysiologischer Untersuchungen auch für *Plasmodium falciparum* infizierte menschliche Erythrozyten postuliert (Desai et al.,

1993; Desai und Rosenberg, 1997). Dagegen spricht allerdings eine aktuelle Untersuchung, in der sich die PVM als wenig permeabel für Ionen (Ca^{2+}) und andere kleine Moleküle (Fluo-3, 765 Da; MAG-Fura-2, 430 Da) erwies (Gazarini et al., 2003). Für *P. falciparum* gibt es außerdem die Theorie, dass Erweiterungen der Membran der parasitophore Vakuole mit der Plasmamembran der Wirtszelle verschmelzen und so Kanäle („parasitophorous duct“) bilden, die den freien Zugang von Makromolekülen aus dem extrazellulären Raum in die parasitophore Vakuole, also bis zur Oberfläche des Parasiten, erlauben (Pouvelle et al., 1991). Die Existenz einer solchen Verbindung ist jedoch umstritten (Pouvelle et al., 1991; Haldar, 1994; Lauer et al., 1997; Hibbs et al., 1997). Auch die Beobachtung, dass sich die Kalziumkonzentration zwischen Vakuole und Extrazellulärraum unterscheidet (Ginsburg, 1994), spricht gegen eine solche nichtselektive Verbindung bei *P. falciparum* infizierten Erythrozyten. Nach einem neueren Modell stellen die Erweiterungen der Membran der parasitophoren Vakuole ein „molekulares Sieb“ dar, das den selektiven Eintritt spezifischer Nahrungsstoffe wie Adenosin, Glutamat und Orotat erlaubt (Lauer et al., 1997). Auch wenn von vielen Forschern angenommen wurde, dass die biochemischen und physiologischen Eigenschaften der parasitophoren Vakuole evolutionär konservativ seien, legen neuere Daten nahe, dass je nach Typ der Wirtszelle und Art des Parasiten Unterschiede bestehen (Lingelbach und Joiner, 1998). Bei Zellen, die mit Sporozoiten von *T. gondii* infiziert wurden, wurden sogar innerhalb ein und desselben Systems zwei verschiedene parasitophore Vakuolen beschrieben (PV1 und PV2), die sich nacheinander in den befallenen Zellen bildeten (Speer et al., 1997). So sind bei der primären Invasion kultivierter Zellen durch *T. gondii*-Sporozoiten typische Merkmale der „klassischen“ Invasion, nämlich die Exozytose der Rhoptrien, Mikronemen und dichten Granula, sowie die Existenz der „moving junction“, nicht festzustellen. Es entsteht zunächst die PV1, deren PVM nach elektronenmikroskopischer Betrachtung als extrem dünn und undeutlich bezeichnet wird (Speer et al., 1997). Während diese PV1 impermeabel für Fluorescein (332 Da) und Lucifer Yellow (457 Da) ist, konnte Lucifer Yellow nach Injektion in die Wirtszelle rasch in die PV2 eintreten, was für die Existenz von Poren in der Membran der PV2 spricht (Tilley et al., 1997).

In dieser Arbeit wurden die Untersuchungen zur PV an *E. bovis*-infizierten VERO-Zellen durchgeführt. Der Sporozoit entwickelte sich in den VERO-Zellen zwar nicht weiter, überlebte dort aber mindestens 3 Wochen innerhalb einer großen Vakuole (vgl. Heise et al., 1997; Hermosilla et al., 2002). So konnte der Sporozoit z. B. 20 Tage nach der Infektion durch Zugabe des Kalziumionophors A23187 (10 μ M) dazu veranlasst werden, seine Wirtszelle zu verlassen (Schröpfer, 2003). Dass die intrazellulären Parasiten trotz der Stagnation im Lebenszyklus noch immer lebensfähig waren, zeigten außerdem auch die Versuche, bei denen Parasiten nach mechanischer Manipulation mit einer Mikropipette an ihrer Wirtszelle diese verlassen und anschließend sogar eine neue Wirtszelle befallen hatten. Im Einzelnen heißt das, der Parasit war in der Lage, die durch mechanische Manipulation an der Wirtszelle hervorgerufenen Veränderungen seiner Umgebung wahrzunehmen, aus eigener Kraft die Wirtszelle zu verlassen, sich in typischer Weise über den Zellrasen zu bewegen, eine neue Wirtszelle zu finden und schließlich auch in diese einzudringen. All das weist auf eine uneingeschränkte Lebensfähigkeit des Parasiten hin und lässt den Schluss zu, dass das Ausbleiben der Entwicklung in diesem Zellkulturmodell nicht auf die unzureichende Vitalität des Parasiten zurückzuführen ist.

Die große PV in diesem Modell eröffnete die Möglichkeit, mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie, Ionenkonzentrationen innerhalb der Vakuole zu messen. Diesen Vorteil bot kein anderes *Eimeria*-Wirtszell-Modell. Die starke Fluoreszenz im Zytosol von Wirtszellen und Parasiten nach der Inkubation der *E. bovis*-infizierten VERO-Zellen mit den AM-Estern der Fluoreszenzfarbstoffe zeigt, dass diese membrangängigen Formen der Fluoreszenzfarbstoffe sowohl die PVM als auch die mehrschichtige Pellikula des Parasiten passieren können. Zudem zeigt sie die Existenz von Esterasen im Zytoplasma des Parasiten an, die, wie die Esterasen der Wirtszelle, AM-Ester spalten können und so den ionensensitiven Farbstoff freisetzen. Die hohe Fluoreszenzintensität im Parasitenzytoplasma zeigt auch an, dass die Pellikula des Parasiten nicht für hydrophile Moleküle mit einem Molekulargewicht ≥ 450 Da (Carboxy-SNARF) permeabel ist. Das stimmt mit den Beobachtungen von Werner-Meier und Entzeroth (1997) überein, die festgestellt hatten, dass die fluoreszierenden Markermoleküle Lucifer Yellow (457 Da) und Biocytin

Lucifer Yellow (850 Da) nicht die Pellikula von intrazellulären Stadien von *E. nieschulzi* passieren können.

Die Tatsache, dass sich die Fluoreszenzintensität von PV und Wirtszellzytosol deutlich unterschied, spricht bei den hier untersuchten *E. bovis*-infizierten VERO-Zellen gegen die Existenz von Poren in der PVM, die die Farbstoffmoleküle ungehindert passieren lassen. Das widerspricht den Ergebnissen von Werner-Meier und Entzeroth (1997), die gezeigt hatten, dass Lucifer Yellow und Biocytin Lucifer Yellow nach Injektion in das Zytosol der Wirtszelle rasch in die PV eindringen. Auch bei *T. gondii*-infizierten menschlichen Fibroblasten hatte sich gezeigt, dass Lucifer Yellow frei durch die PVM diffundieren konnte (Schwab et al., 1994). Sollte die PVM generell als „molekulares Sieb“ fungieren, das im Falle von *E. nieschulzi* die Passage von Molekülen bis 850 Da zulässt, dann hätte sich die Konzentration von Indo 1 (645 Da) bzw. Carboxy-SNARF (453 Da) zwischen PV und Zytosol der Wirtszelle ausgleichen müssen.

Innerhalb der PV scheint es keine Esterasen zu geben, die in der Lage wären, die AM-Ester zu spalten und den Farbstoff so in der PV zu halten. Die geringe aber signifikante Fluoreszenz innerhalb der PV könnte zwar auf eine geringe Aktivität von Esterasen in der PV deuten, aber die langsame Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit spricht eher dafür, dass der Farbstoff langsam aus dem Zytosol von Parasit und Wirtszelle in die PV leckt.

Die langsame Zunahme der Fluoreszenz spricht auch gegen die Existenz von schlauchförmigen Verbindungen („parasitophorous duct“) zwischen PV und der extrazellulären Umgebung. Eine solche Verbindung wurde für *P. falciparum*-infizierte Erythrozyten postuliert (Pouvelle et al., 1991), ist aber umstritten (Pouvelle et al., 1991; Haldar, 1994; Lauer et al., 1997; Hibbs et al., 1997). Die Existenz einer solchen nichtselektiven Verbindung würde zum Verlust von Farbstoff aus der PV führen und damit auch zum Verlust und nicht zum langsamen Anstieg der Fluoreszenz. Auch bei *E. nieschulzi*-infizierten IEC6-Zellen (eine Zelllinie aus dem Rattendarm) konnte keine solche Verbindung nachgewiesen werden (Werner-Meier und Entzeroth, 1997).

Viele Eigenschaften der PV in *E. bovis*-infizierten VERO-Zellen, nämlich ihre Größe, das Fehlen von Poren und das Ausbleiben der Entwicklung des Parasiten, stimmen mit der vorübergehenden PV (PV1) überein, wie sie für *T. gondii*-infizierte Wirtszellen

beschrieben wurde (Speer et al., 1995; Speer et al., 1997; Tilley et al., 1997). Die Replikation der Parasiten wurde bei *Toxoplasma* immer nur in PV2 beobachtet. Möglicherweise steht die Stagnation im Lebenszyklus von *E. bovis* in engem Zusammenhang mit einer unveränderten PV in VERO-Zellen.

4.3 Der Einfluss der Infektion auf die Ca^{2+} -Homeostase der Wirtszelle

Ca^{2+} -Ionen sind als ubiquitärer, intrazellulärer Botenstoff an der Regulation vielfältiger physiologischer Prozesse beteiligt. Gleich bei der ersten Interaktion zwischen Parasit und Wirtszelle, nämlich bei der Invasion, spielt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (in Parasit und Wirtszelle) eine wichtige Rolle (Docampo und Moreno, 1996). Bei einigen intrazellulären Parasiten wurde beobachtet, dass Ca^{2+} -Signale im Zytosol des eindringenden Parasiten am Invasionsprozess beteiligt sind. Berichte darüber existieren z. B. für *Trypanosoma cruzi* (Moreno et al., 1994), *Theileria parva* (Shaw, 1995) und *Toxoplasma gondii* (Pezella et al., 1997). Die Bedeutung dieser Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ liegt wohl in der Regulation der Prozesse am Apikalkomplex des Parasiten nach dessen Anheftung an die Wirtszelle. Zu diesen kalziumgesteuerten initialen Vorgängen der Invasion gehören z. B. die Freisetzung der Mikronemenproteine (Carruthers und Sibley, 1999) und das Ausschleudern des Konoids (Mondragon und Frixione, 1996). Aber auch Ca^{2+} -Signale innerhalb der Wirtszelle scheinen an der Invasion beteiligt zu sein. Erhöhungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Wirtszelle im Zusammenhang mit der Invasion wurden z. B. bei *Leishmania donovani* (Misra et al., 1991), *Trypanosoma cruzi* (Moreno et al., 1994; Tardieux et al., 1994; Rodriguez et al., 1995) und *Toxoplasma gondii* (Vieira und Moreno, 2000) beobachtet.

Auch im Verlauf der intrazellulären Entwicklung wurde bei verschiedenen intrazellulären Erregern eine Modulation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des Parasiten oder der Wirtszelle beobachtet. Bereits 1985 wurde eine erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in *Leishmania major* infizierten Makrophagen beobachtet (Eilam et al., 1985). Für *Plasmodium falciparum* wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]$ wesentlich für die Entwicklung des Parasiten ist (Krishna und Squire-Pollard, 1990). Innerhalb der Erythrozyten steigt die $[\text{Ca}^{2+}]$ lokal im Bereich des Parasiten, also im Parasit und/oder der parasitophoren Vakuole an und erreicht im Ringstadium ihr Maximum (Adovelando et al., 1993). Nach Infektion mit *Trypanosoma cruzi* zeigten endotheliale

Wirtszellen sowohl eine Erhöhung der basalen $[Ca^{2+}]_i$, als auch Veränderungen des Kalziumsignals nach Stimulation (Morris et al., 1988). Kalziummessungen an *Toxoplasma gondii* infizierten KB-Zellen (menschliche Epidermiskarzinom-Zelllinie) zeigten ebenfalls eine Veränderung der basalen $[Ca^{2+}]_i$. Im Gegensatz zu den *Trypanosoma cruzi* infizierten Endothelzellen wurde hier jedoch keine erhöhte, sondern eine verringerte $[Ca^{2+}]_i$ nach Infektion beobachtet (Pingret et al., 1996). Erklärungsversuche für diese Veränderungen gibt es kaum. Lediglich für Zellen des Immunsystems wurde darüber spekuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Fehlfunktionen von Monozyten nach Infektion mit *Leishmania donovani* mit einer gestörten Signaltransduktion, an der auch Ca^{2+} beteiligt ist, in Verbindung stehen (Olivier et al., 1992a; Olivier et al., 1992b). Wenn diese Zellen an der Ausbildung einer effektiven Immunabwehr gehindert werden, kann das für den Erfolg der Infektion von Vorteil sein (Olivier, 1996).

Auch in dieser Arbeit wurden an verschiedenen Zellkulturmodellen Kalziummessungen durchgeführt, um nach Hinweisen auf die Beteiligung von Ca^{2+} am Infektionsgeschehen zu suchen.

4.3.1 Ca^{2+} -Konzentration in der ruhenden Zelle

An den mit *E. bovis* infizierten VERO-Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit die $[Ca^{2+}]$ in den verschiedenen Kompartimenten (Zytoplasma der Wirtszelle, Lumen der PV und Zytoplasma des Parasiten) untersucht. Vergleichbare Untersuchungen zur räumlichen Verteilung der $[Ca^{2+}]_i$ kokzidieninfizierter Zellen sind rar. Bei Untersuchungen an *P. falciparum* infizierten Erythrocyten (Adovelando et al., 1993) und *T. gondii*-infizierten KB-Zellen (Pingret et al., 1996) unterschieden die Autoren nicht zwischen Parasit und PV. In beiden Fällen zeigte sich aber im Bereich der PV (Lumen und Parasit) eine höhere $[Ca^{2+}]$ als im Zytoplasma der Wirtszelle. Unter der Annahme, dass große, unspezifische Poren in der PVM *T. gondii*-infizierter Zellen (Schwab et al., 1994) bzw. große, unspezifische Kanäle in der PVM *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten existieren (Desai et al., 1993; Desai und Rosenberg, 1997), ist davon auszugehen, dass ein Ionengradient über die PVM nicht aufrecht erhalten werden kann. Demnach müssten also die $[Ca^{2+}]$ im Lumen der PV und im Zytoplasma der Wirtszelle identisch sein, so dass die höhere $[Ca^{2+}]$ dem Zytoplasma des Parasiten entspräche. Eine neuere Arbeit (Gazarini et al., 2003) widerspricht dieser

Einschätzung. Die Autoren zeigten, dass die $[Ca^{2+}]$ der PV *P. falciparum*- oder *P. chabaudi*-infizierter Erythrozyten kurz nach der Infektion deutlich höher als die von Wirtszelle und Parasit ist.

In jedem Fall zeigen die Untersuchungen an den *E. bovis*-infizierten VERO-Zellen ein anderes Bild. Hier wurden keine Unterschiede der $[Ca^{2+}]$ zwischen Wirtszellzytoplasma, PV und Parasit festgestellt. Eine Diskussion dieser Ergebnisse vor dem Hintergrund der Literatur fällt schwer, da die wenigen Untersuchungen dieser Art von verschiedenen Untersuchungsobjekten stammen und, vielleicht aus diesem Grunde, sehr widersprüchlich sind. Interessant wäre hier ein Vergleich mit dem frühen Stadium (PV1) bei Infektionen mit *T. gondii*-Sporozysten, da einige Parallelen zum VERO/*E. bovis*-Modell bestehen. Solche Daten bei *T. gondii* stehen bislang nicht zur Verfügung.

Bei keiner der in dieser Arbeit untersuchten Parasit-Wirtszell-Modelle (VERO/*E. bovis*, BSLEC/*E. bovis* und HT29/*E. separata*) zeigte sich im Verlauf der Infektion ein Unterschied in der $[Ca^{2+}]_i$ zwischen Wirtszellen und nicht infizierten Kontrollzellen. Auch bei *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten, bei denen eine erhöhte $[Ca^{2+}]$ im Bereich der Parasiten gemessen wurde, ist die zytosolische $[Ca^{2+}]$ außerhalb dieses Bereiches nicht höher als in normalen Erythrozyten (Adovelando et al., 1993). Und während sich in *T. gondii*-infizierten KB-Zellen eine reduzierte $[Ca^{2+}]_i$ zeigte (Pingret et al., 1996), wurde für eine Reihe anderer intrazellulärer Erreger, die nicht zu den Apikomplexa gehören, nämlich *Entamoeba histolytica* (Ravdin et al., 1988), *Trypanosoma cruzi* (Morris et al., 1988), *Leishmania donovani* (Olivier et al., 1992a), *L. major* (Eilam et al., 1985), *Salmonella typhimurium* (Bliska et al., 1993) und HIV (Pinching und Nye, 1990), eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ der Wirtszelle beschrieben (besprochen in Olivier, 1996). Die Literatur zeigt hier ein sehr uneinheitliches Bild. Das mag daran liegen, dass es sich um viele verschiedene Erreger handelt. Allerdings gibt es nur wenige solche Untersuchungen und es bleibt wohl erst einmal abzuwarten, ob weitere Untersuchungen die Ergebnisse bei den jeweiligen Erregern bestätigen.

4.3.2 Ca^{2+} -Konzentration nach Stimulation

Die Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration spielt eine Schlüsselrolle in vielen verschiedenen Zellfunktionen. Eine dieser kalziumabhängigen Funktionen ist die Produktion vasoaktiver Substanzen und deren Freisetzung aus Endothelzellen der Blutgefäße (Inagami et al., 1995). Die Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von Endothelzellen, die durch verschiedene Agonisten wie Acetylcholin, ATP, Bradykinin und andere induzierbar sind (Nilius et al., 1997), bestehen aus einem initialen, kurzzeitigen Spitzenwert, hervorgerufen durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus IP_3 -sensitiven Speichern, gefolgt von einer anhaltenden Erhöhung, die durch den Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen aufrecht erhalten wird (Clapham, 1995). Die Wirkung von ATP wird hierbei typischerweise durch P_2 -Rezeptoren vermittelt (Pirotton et al., 1993). Untersuchungen an lymphatischen Endothelzellen sind generell rar. So ist auch kaum Literatur über Ca^{2+} -aktivierende Agonisten am lymphatischen Endothel zu finden. Gao et al. (1999) konnten aber eine lymphatische Vasomotion nachweisen, die endothelabhängig über P_2 -Purinrezeptoren vermittelt wird.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass auch die hier verwendeten lymphatischen Endothelzellen (BSLEC) auf extrazelluläres ATP mit einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reagieren. Die Stimulation nicht infizierter BSLEC durch ATP führte zu einer Reaktion, wie sie auch für Endothelzellen aus Blutgefäßen typisch ist. Sowohl der biphasische Verlauf des Ca^{2+} -Signals als auch bestimmte Eigenheiten der beiden Phasen deuten auf denselben Mechanismus wie bei den Endothelzellen der Blutgefäße: Die vollständige Unterdrückung der Ca^{2+} -Antwort durch Suramin, welches P_2 -Rezeptoren blockiert (Kennedy, 1990; Ralevic und Burnstock, 1998), weist auf eine P_2 -Rezeptor-vermittelte Reaktion hin. Bei Ca^{2+} -freien extrazellulären Bedingungen blieb der schnelle Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf den Spitzenwert erhalten, was bedeutet, dass dieser nicht durch den Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen, sondern durch eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern hervorgerufen wurde. Das Fehlen extrazellulären Kalziums führte aber zum Wegfall der zweiten Phase des intrazellulären Ca^{2+} -Signals (die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fiel direkt auf den Ruhewert zurück). Die anhaltende Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, war also auf einen Ca^{2+} -Einstrom von außen zurückzuführen.

Einflüsse von intrazellulären Pathogenen auf die Ca^{2+} -Signalwege ihrer Wirtszellen wurden für kultivierte Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene, infiziert mit *Trypanosoma cruzi*, und für menschliche Monozyten, infiziert mit *Leishmania donovani*, beschrieben (Morris et al., 1988; Olivier et al., 1992a). In beiden Fällen zeigte sich in infizierten Zellen neben der Veränderung der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (sie war jeweils verdoppelt) auch ein Einfluss der Infektion auf die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären, IP_3 -sensitiven Speichern nach einem extrazellulären Stimulus. Während der absolute Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den *T. cruzi*-infizierten Endothelzellen nach einem extrazellulären Stimulus (z. B. Bradykinin) gegenüber Kontrollzellen erhöht war, war die mit FMLP stimulierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in *L. donovani*-infizierten Monozyten gegenüber den Kontrollzellen abgeschwächt. Die Veränderung des Ca^{2+} -Signals stand bei den Endothelzellen im Zusammenhang mit einer erhöhten und bei den Monozyten mit einer reduzierten IP_3 -Konzentration.

Für die BSLEC war bis zum 8. Tag nach der Infektion keine infektionsabhängige Veränderung des ATP-stimulierten Ca^{2+} -Signals zu beobachten. Der in Abbildung 32 auffällig, nach dem t-Test jedoch nicht signifikant verringerte Peak bei infizierten Zellen 8 Tage nach Infektion verlangt eigentlich nach Wiederholung der Versuche. Eine Erhöhung der Versuchsanzahl würde den Unterschied möglicherweise statistisch absichern. Aber wie bereits in 3.4.1 ausgeführt, ergeben sich mit dem verwendeten Laser-Konfokal-Mikroskop Probleme bei der Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, wenn sich die untersuchte Zelle nicht mehr in der gleichen Fokusebene befindet, wie die Kontrollzellen. Für die am 8. Tag nach der Infektion aus dem Zellrasen herausgehobenen infizierten Zellen machte sich dieser Fehler schon mit einem scheinbar erhöhten Basalwert bemerkbar. Da der Spitzenwert in % vom Basalwert angegeben wurde, kann das der Grund für den reduzierten Spitzenwert sein.

Auch in den HT29-Zellen ließ sich durch ATP ein Ca^{2+} -Signal hervorrufen. Das Ca^{2+} -Signal hat den gleichen biphasischen Verlauf wie in den Endothelzellen. Auch hier kommt es zur P_2 -Rezeptor-vermittelten Freisetzung von Ca^{2+} aus IP_3 -sensitiven intrazellulären Speichern und einem nachfolgenden Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum (Nitschke et al., 1993; Höpfner et al., 1998). Im Gegensatz zu den *E. bovis*-infizierten BSLEC zeigte sich bei den *E. separata*-infizierten HT29-Zellen, in Übereinstimmung mit den Untersuchungen an *L. donovani*-infizierten Monozyten (Olivier et al., 1992a), ein

reduziertes Ca^{2+} -Signal nach Stimulation mit ATP. Eine Verminderung des Kalziumgehaltes IP_3 -sensitiver Speicher durch den intrazellulären Parasiten kann als Ursache für diese Veränderung ausgeschlossen werden. Thapsigargin, welches die Ca^{2+} -ATPasen dieser Speicher hemmt und so zu deren Entleerung und damit zum Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt, hatte bei infizierten und nicht infizierten Zellen die gleiche Wirkung; ein Unterschied im Ausmaß der Ca^{2+} -Erhöhung war nicht festzustellen. Außerdem war der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Stimulation mit Carbachol in nicht infizierten und infizierten Zellen gleich groß. Carbachol löst bei HT29-Zellen ebenfalls ein biphasisches Ca^{2+} -Signal aus, wobei auch hier der Spitzenwert auf die Freisetzung aus intrazellulären Speichern und die anhaltende Erhöhung auf den Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen zurückzuführen ist (Fischer et al., 1992). Die an HT29 Zellen nachgewiesenen Acetylcholinrezeptoren sind muskarinische M3-Rezeptoren (Kopp et al., 1989). Deren Aktivierung (in der vorliegenden Arbeit durch das Acetylcholin-Analogon Carbachol) führt über die Erhöhung des IP_3 -Spiegels zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (Felder, 1995). Da in HT29-Zellen die Signaltransduktion sowohl für ATP als auch für Carbachol über die Phospholipase C führt (Cummins et al., 2000), muss das „Angriffsziel“ des Parasiten entweder der Rezeptor selber sein oder das daran gekoppelte G-Protein, das dann die Phospholipase C aktiviert.

ATP stimuliert in HT29-Zellen die Elektrolyt- und Mukussekretion (Merlin et al., 1994). Luminale P_2 -Rezeptoren könnten demnach bei Abwehrmechanismen im Darmtrakt eine Rolle spielen, indem die purinerg aktivierte Flüssigkeits- und Mukussekretion der Entfernung schädlicher Substanzen vom Epithel dient. Eine Reduktion der induzierbaren Sekretion könnte die Parasiten davor bewahren, von ihrem bevorzugten Wirtsepithel weggeschwemmt zu werden, und den Merozoiten so die schnelle Invasion neuer Wirtszellen erleichtern.

4.4 Elektrophysiologie

Für das Überleben intrazellulärer Parasiten ist die Bereitstellung von Nahrung und die Entsorgung von Abfallprodukten durch die Wirtszelle von großer Bedeutung. Da der Parasit, der sich in der Zelle entwickelt und vermehrt, einen enormen Nahrungsbedarf hat,

liegt die Vermutung nahe, dass zu seiner Versorgung und zur Entsorgung der Abfallprodukte die ursprünglichen Transportkapazitäten der Wirtszellmembran nicht ausreichen. Mit der Patch-Clamp-Technik steht ein empfindliches Werkzeug zur Untersuchung von Eigenschaften der Zellmembran zur Verfügung. Erst in jüngster Zeit wird diese Technik auch in der parasitologischen Forschung vermehrt eingesetzt. Dabei befassen sich die bisherigen elektrophysiologischen Untersuchungen aber fast ausschließlich mit den Malariaerregern *Plasmodium spp.* Untersuchungen an infizierten Erythrozyten zeigten, dass der Parasit die Permeabilität der Wirtszellmembran drastisch verändert (Übersicht in Staines et al., 2004). Diese neuen, durch die Infektion induzierten Leitfähigkeiten könnten für neue Medikamente ein Angriffspunkt oder ein selektiver Eintrittsweg in die infizierte Zelle sein.

Neben den Untersuchungen an *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten gibt es kaum Berichte über den Einfluss von Kokzidien auf elektrophysiologische Eigenschaften ihrer Wirtszellen. Für *T. gondii*-infizierte menschliche Monozyten wurde beschrieben, dass die Infektion eine Hyperpolarisation der Wirtszellmembran zur Folge hat. 24 bzw. 48 Stunden nach der Infektion konnte mit Hilfe von membranpotenzialsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen eine signifikante Hyperpolarisation der Zellmembran infizierter Zellen festgestellt werden (Bouchot et al., 2001). An Monolayern von HT29/B6-Zellen wurde der Einfluss einer *T. gondii*-Infektion auf den transepithelialen Ionentransport untersucht. Infizierte Monolayer (ca. 30% der Zellen waren infiziert) zeigten hier eine zwei bis drei mal höhere Leitfähigkeit als die Kontrollen (Kowalik et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde an verschiedenen Zelltypen versucht, Einflüsse der *Eimeria*-Infektion auf elektrophysiologische Parameter der Wirtszelle mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik zu untersuchen.

Die HT29/B6-Zellen stellten sich als wenig tauglich für Patch-Clamp-Untersuchungen heraus. Der auf ihnen haftende Mukus macht das Patchen fast unmöglich. Mit Hilfe des schleimlösenden Wirkstoffes DTT gelangen zwar Messungen, jedoch keine Ganzzellableitungen. Auch Messungen in der „Inside-Out“-Konfiguration gelangen trotz intensiver Bemühungen nicht regelmäßig, so dass es keine Aussicht gab, in absehbarer Zeit

auswertbare Ergebnisse zu erzielen. Die Patch-Clamp-Untersuchungen an den HT29/B6-Zellen wurden daher nicht weitergeführt.

Von VERO-Zellen existieren kaum elektrophysiologische Daten. Bisher sind an VERO-Zellen (endogen) nur Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanäle untersucht worden (Geletyuk et al., 1995; Kazachenko und Chemeris, 1998; Hafting und Sand, 2000; Kochetkov et al., 2000). In dieser Arbeit konnte in der „Inside-Out“-Konfiguration ein offensichtlich vom Membranpotenzial abhängiger Chloridkanal nachgewiesen werden, der für VERO-Zellen bislang nicht beschrieben wurde. Vor der Untersuchung eines eventuellen parasitären Einflusses mussten zunächst die endogenen Leitfähigkeiten ausreichend charakterisiert werden. Für die grundlegende Charakterisierung endogener Leitfähigkeiten sind aber Ganzzellableitungen eine Voraussetzung. Auch wenn es bei den VERO-Zellen relativ einfach gelang, genügend hohe Abdichtwiderstände zu erzielen, so gestaltete sich der Übergang in die „Whole-Cell“-Konfiguration doch sehr schwierig. Diese Schwierigkeiten könnten damit zusammengehangen haben, dass als Methode für den Durchbruch des Membranfleckes die Applikation eines Spannungspulses gewählt wurde. Dabei kann es zum „Resealing“ oder zum kompletten Verlust des „Seals“ kommen (Numberger und Draguhn, 1996). Dieses Problem, das mit entsprechendem Aufwand sicher zu überwinden gewesen wäre, war nicht der einzige Grund dafür, dass die Patch-Clamp-Experimente schließlich auch an diesen Zellen eingestellt wurden. Da sich *E. bovis* in den VERO-Zellen nicht weiterentwickelt, wäre die Aussagekraft der Ergebnisse ohne einen Vergleich mit einem „intakten“ System nicht eben groß. Ein solches in vitro Parasit-Wirtszellsystem lag inzwischen mit den BSLEC, in denen *E. bovis* die komplette erste Schizogonie durchläuft, vor. Die Bemühungen wurden also an diesem System fortgesetzt.

Die nicht infizierten BSLEC eigneten sich gut für Patch-Clamp-Experimente, und es gelang, eine zuverlässige Methode zur Erreichung der „Whole-Cell“-Konfiguration zu finden. Von diesen Zellen existieren bislang keinerlei elektrophysiologische Daten. Aber es gibt eine Reihe von elektrophysiologischen Untersuchungen an Endothelzellen von Blutgefäßen (Übersicht in Nilius und Droogmans, 2001). Für die hier untersuchten lymphatischen Endothelzellen ergaben sich in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften deutliche Übereinstimmungen mit diesen. So zeigte die Strom-Spannungs-Beziehung in

der ruhenden Zelle den gleichen Verlauf wie bei Endothelzellen aus der Pulmonararterie von Kälbern (CPAE cells, calf pulmonary artery endothelial cells), und der charakteristische, einwärts gleichrichtende K^+ -Strom ließ sich wie bei diesen durch Ba^{2+} hemmen (Voets et al., 1996). Bei dem Chloridkanal, der bei Messungen in der „Inside-Out“-Konfiguration gefunden wurde, handelte es sich offensichtlich um einen „hochleitfähigen Chloridkanal“ (high-conductance Cl^- channel, B_{Cl}). Diese Kanäle, die offensichtlich von allen anderen beschriebenen Cl^- -Kanälen verschieden sind, wurden gelegentlich in Endothelzellen beobachtet. Mit 300 pS besaß der hier detektierte Kanal eine für diese Kanäle typische Einzelkanalleitfähigkeit, die mit 113 bis 400 pS angegeben wird (Nilius und Droogmans, 2001). Nachgewiesen wurden solche Kanäle schon in Endothelzellen aus der Aorta von Schwein und Rind (Groschner und Kukovetz, 1992; Olesen und Bundgaard, 1992). Die Aktivität eines einzelnen solchen Kanals müsste aufgrund der großen Einzelkanalamplitude auch in einer Ganzzelleableitung auffallen (bei einer Klemmspannung von +60 mV betrug der Einzelkanalstrom über 20 pA, während der Gesamtstrom einer BSLEC bei gleichem Membranpotenzial je nach Zelle 10 bis 80 pA betrug). Entsprechende Ströme waren aber nie in Ganzzelleableitung zu beobachten - typisch für die B_{Cl} -Kanäle, die in intakten Zellen inaktiv sind und erst nach dem Herausreißen des Membranflecks („Outside-Out“- bzw. „Inside-Out“-Konfiguration) aktiv werden (Nilius und Droogmans, 2001).

Patch-Clamp-Experimente an infizierten Zellen gelangen kaum. Das Problem war, dass intrazelluläre Sporozoiten offensichtlich die durch die Patchpipette verursachten Störungen bemerkten und sich dann in der Zelle bewegten, was zum Verlust des Abdichtwiderstandes und damit zur Beendigung der Messung führte. Die langsame Entwicklung der *E. bovis*-Sporozoiten zum Schizonten brachte es mit sich, dass spätere, unbewegliche Stadien der Parasiten auch nach Infektion von subkonfluenten Endothelzellen stets erst in konfluenten Monolayern zu finden waren. Die Probleme, die sich hieraus und aus der nötigen Trypsinbehandlung ergaben, vereitelten erfolgreiche Patch-Clamp-Messungen an infizierten Zellen.

Für Patch-Clamp-Untersuchungen an Kokzidien-infizierten Zellen scheint *E. bovis* aus verschiedenen Gründen nicht die beste Wahl zu sein. Der *E. bovis*-Sporozoit befällt

lymphatische Endothelzellen, ein Zelltyp der bei Elektrophysiologen bislang keine Beachtung fand. Das hat zur Folge, dass ein erheblicher Teil der Arbeit für die Charakterisierung der Wirtszelle aufgewendet werden muss. Die Entwicklung vom Sporozoiten zum reifen Schizonten dauert ungewöhnlich lange, was in der Zellkultur problematisch sein kann. Die Wirtszellen müssen sich entsprechend lange halten, ohne dass sie sich, wie es meist der Fall ist, nach Erreichen der Konfluenz bald vom Boden des Kulturgefäßes ablösen. Für den „Patch-Clamper“ ergibt sich zusätzlich das Problem, dass schon der Trophozoit nur in Zellen zu finden ist, die schon engen Kontakt zu benachbarten Zellen haben. Aufgrund der Gap Junctions sind „Whole-Cell“-Messungen an solchen Zellen nicht möglich. Ein weiteres Manko ist die aufwendige Beschaffung der *E. bovis*-Sporozoiten, die nur über den Weg der Infektion von Kälbern zu verwirklichen ist.

Eine in dieser Hinsicht bessere Wahl wären möglicherweise die anderen in dieser Arbeit verwendeten Parasiten *T. gondii* und *N. caninum*. Von diesen beiden ist *T. gondii* der besser untersuchte Parasit. Er befällt alle kernhaltigen Zellen, so dass man sich als Wirtszellen verschiedene, elektrophysiologisch gut charakterisierte Zellen aussuchen könnte. Außerdem entwickelt er sich schnell, was die Möglichkeit eröffnet, auch Wirtszellen mit späteren (nicht mehr mobilen) Entwicklungsstadien zu untersuchen, bevor adhärente Wirtszellen einen konfluenten Monolayer gebildet haben. Neben der im Vergleich zur „*E. bovis*-Produktion“ einfacheren und billigeren Vermehrung der *T. gondii*-Tachyzoiten in der Peritonealhöhle von Mäusen (Jones et al., 1958), gibt es außerdem die Möglichkeit, die Tachyzoiten in der Zellkultur zu vermehren (Evans et al., 1999). Ein Nachteil bei der Verwendung von *T. gondii* als „Modell-Parasit“ wäre, dass es sich dabei um eine humanpathogene Art handelt. Entsprechende Sicherheitsanforderungen an das Labor und an den Umgang mit dem Parasiten wären zu erfüllen.

4.5 Egress

4.5.1 Ca^{2+} -induzierter Egress der *E. bovis*-Sporozoiten

In verschiedenen Arbeitsgruppen konnte der Egress von *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten aus ihren Wirtszellen experimentell induziert werden, indem die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Wirtszelle erhöht wurde. Die Zugabe des Kalziumionophors A23187 (0,25 bis 1 μM) in das

extrazelluläre Medium (Endo et al., 1982) und die Mikroinjektion von Ca^{2+} (1 mM CaCl_2 in 150 mM KCl) in die Wirtszelle (Schwab et al., 1994) führten dabei zum Egress des Parasiten. Vieles spricht dafür, dass auch der unfreiwillig herbeigeführte Egress der *E. bovis*-Sporozoiten aus frisch infizierten Zellen (0 dpi) während der Beladung mit Farbstoffen oder bei Patch-Clamp-Experimenten auf einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zurückzuführen ist. Durch mechanische Stimulation können in Endothelzellen viele Signalwege aktiviert werden, wobei eine Reihe von Molekülen, darunter auch Kalzium-Ionen, involviert sind (besprochen in Davies, 1995). An kultivierten Endothelzellen (BAEC und „calf pulmonary artery endothelial cells“, CPAE) zeigte sich, dass der durch mechanische Stimulation hervorgerufene Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären, IP_3 -sensitiven Kalziumspeichern vermittelt wird (Niggel et al., 2000; Moerenhout et al., 2001b). Sowohl bei den Patch-Clamp-Experimenten, als auch bei den Vorbereitungen zu den intrazellulären Ionenmessungen kommt es zwangsläufig zur mechanischen Stimulation der untersuchten Zellen. Bei dem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, wie er nach mechanischer Reizung der Wirtszelle auftreten kann, handelt es sich um eine physiologische Reaktion der Wirtszelle. Zwar konnte die Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei mechanischer Stimulation im Patch-Clamp-Experiment oder bei dem durch Lösungswechsel verursachten mechanischen Stress in den Waschsritten während der Beladung mit ionensensitiven Farbstoffen nicht gemessen werden, aber in den Untersuchungen von Moerenhout et al. (2001a) zeigte sich, dass die durch eine Glasmikropipette verursachte mechanische Stimulation bei Endothelzellen (CPAE) zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt, die etwa so hoch ist wie nach der Stimulation mit 100 μM ATP. Am Beispiel der CPAE bedeutet das einen Anstieg von ca. 50 nM in Ruhe auf einen Spitzenwert von ca. 650 nM und einen anschließenden Rückgang auf einen dauerhaft erhöhten Wert von 200-300 nM (Weintraub et al., 1992). Im Gegensatz zu dieser physiologischen Reaktion der Wirtszelle, wurde der Egress von *T. gondii*-Tachyzoiten (s. oben) durch eine drastische Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf hohe, unphysiologische Werte herbeigeführt. Der Einsatz des Kalziumionophors A23187 macht Biomembranen permeabel für Ca^{2+} -Ionen, so dass diese aus der umgebenden Lösung und aus intrazellulären Speichern ins Zytosol strömen. Dadurch kommt es zur Angleichung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ an die $[\text{Ca}^{2+}]$ der extrazellulären Lösung, die im genannten Beispiel (Endo et al., 1982) bei

1,8 mM lag. Auch bei der Mikroinjektion (Schwab et al., 1994) wurde eine Lösung mit hoher Kalziumkonzentration (1 mM CaCl_2) verwendet.

Die Experimente in der vorliegenden Arbeit, bei denen der *E. bovis*-Sporozoit seine BSLEC-Wirtszelle nach Stimulation mit 100 μM ATP verlässt, zeigen zum ersten mal, dass tatsächlich eine physiologische Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Wirtszelle ausreicht, um einen Egress zu provozieren. Allerdings wurde ein Egress von *E. bovis* Sporozoiten aus BSLEC nach mechanischer Stimulation oder Gabe von ATP in der Regel nur bei frisch infizierten Zellen beobachtet. Schon einen Tag nach der Infektion zeigten *E. bovis*-Sporozoiten keine erkennbare Reaktion mehr auf die Stimulation mit ATP, während sie jedoch nach Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Behandlung mit A23187 die Wirtszelle verließen. Die *E. bovis*-Sporozoiten scheinen also nur in der frühen intrazellulären Phase auf ein Ca^{2+} -Signal in der Wirtszelle so zu reagieren, dass sie die Zelle verlassen. Es könnte sein, dass die Parasiten in dieser kurzen Phase selbst mit einem intrazellulären Ca^{2+} -Signal reagieren, wenn die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in ihrer Wirtszelle ansteigt. In Übereinstimmung mit Stommel et al. (1997) und Moudy et al. (2001) könnte ein solcher Ca^{2+} -Anstieg innerhalb des Parasiten der eigentliche Auslöser für den Egress sein. Die Wirksamkeit von Ca^{2+} -Ionophoren als Auslöser für den Egress auch in der späteren intrazellulären Phase könnte demnach, unabhängig von unphysiologisch hohen Ca^{2+} -Konzentrationen, damit erklärt werden, dass diese Substanzen direkt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des Parasiten erhöhen. Dafür sprechen auch andere Versuche, bei denen ein Egress ausgelöst wurde, ohne die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Wirtszelle dauerhaft zu erhöhen. Trotz Ca^{2+} -freier extrazellulärer Lösung konnte mit A23187 der Egress von *T. gondii*-Tachyzoiten aus Makrophagen induziert werden (Endo et al., 1982). Das Reagenz Dithiothreitol (DTT) induziert einen Egress intrazellulärer *Toxoplasma*-Tachyzoiten ebenfalls über einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Stommel et al., 1997). Hierbei führten auch Versuche, in denen die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Wirtszelle durch Ca^{2+} -Chelatoren (BAPTA-AM, intrazellulär und EGTA, extrazellulär) verhindert wurde, zum Egress des Parasiten. Die Autoren vermuten, dass Ca^{2+} -Ionen nahe am Parasiten oder innerhalb des Parasiten die Motilität des Parasiten aktivieren. In einer weiteren Arbeit, in der der Verlust des zytoplasmatischen Kaliums als Auslöser für den Egress des Parasiten angesehen wird, wird ebenfalls ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem die Erhöhung

der $[Ca^{2+}]_i$ des Parasiten (vermittelt durch eine parasitäre Phospholipase C) für den Egress verantwortlich ist (Moudy et al., 2001).

Warum einen Tag nach der Infektion eine Stimulation der BSLEC-Wirtszelle mit ATP nicht mehr zum Egress des *E. bovis*-Sporozoiten führt ist unklar. Die Idee, dass das ATP-stimulierte Ca^{2+} -Signal in der Wirtszelle durch Einflussnahme des intrazellulären Parasiten unterdrückt wird, konnte hier ausgeschlossen werden. Die Reaktion auf ATP zeigte sich bei infizierten BSLEC auch einige Tage nach der Infektion unverändert gegenüber den nicht infizierten Kontrollzellen. Die Ursache liegt also entweder direkt beim Parasiten, der auf eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ seiner Wirtszelle nicht mehr mit Egress reagiert, oder aber, das Ca^{2+} -Signal dringt gar nicht mehr bis zu ihm vor. Als einzige Barriere zwischen Wirtszellzytosol und Parasit kann nur die PVM dieses Ca^{2+} -Signal vom Parasiten fernhalten. Möglicherweise handelte es sich bei den Parasiten, die die Zelle verlassen haben, um solche, die auf dem „alternativen Weg“ in die Zelle eingedrungen und daher gar nicht von einer PVM umgeben waren. Eine andere Erklärung wäre, dass sich die PVM innerhalb eines Tages so verändert, dass sie zunächst permeabel, später aber impermeabel für Ca^{2+} ist. An der Motilität des Parasiten liegt es jedenfalls nicht. Parasiten, die einen Tag nach der Infektion auf eine Stimulation der BSLEC-Wirtszellen mit ATP nicht reagierten, verließen die Zelle, nachdem die Membranen mit A23187 für Ca^{2+} permeabilisiert wurden. Nach der Behandlung mit dem Ca^{2+} -Ionophor ließ die Beweglichkeit der Parasiten sehr bald nach. Das erstaunt nicht, da die Ionophore natürlich auch an den Parasitenmembranen wirken und die folgende dauerhaft hohe $[Ca^{2+}]_i$ schließlich zum Zelltod führt.

Bei dem durch ATP stimulierten Egress verletzte der Parasit die Wirtszellmembran ganz offensichtlich. Während die $[Ca^{2+}]_i$ dabei sprunghaft anstieg, was man dem Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen zuschreiben kann, ging der Fluoreszenzfarbstoff aus der Zelle verloren. Das unterschiedliche Ausmaß in dem sich die beiden Fluoreszenzintensitäten veränderten, lässt sich einfach dadurch erklären, dass die Membran für die Farbstoffmoleküle permeabel wurde. Dem durch den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg verursachten Anstieg der F460 steht die Abnahme der F460 durch Verlust des Farbstoffes aus der Zelle gegenüber. Es resultiert eine im Vergleich zum Ca^{2+} -Anstieg eher geringe Steigerung der F460.

Dagegen wird die durch den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg verursachte Abnahme der F405 durch den Verlust des Farbstoffes noch verstärkt.

4.5.2 Ca^{2+} -induzierter Egress von Merozoiten aus reifen Schizonten

Bei in vitro Kulturen verschiedener Zelllinien die mit *Sarcocystis neurona* infiziert waren, ließ sich mit dem Kalziumionophor A23187 die synchrone Freisetzung von Merozoiten aus reifen Schizonten herbeiführen (Ellison et al., 2001). Die massenhafte Freisetzung von Merozoiten aus adhären Wirtszellen erlaubt die schnelle Gewinnung einer relativ reinen Parasitensuspension aus dem Kulturüberstand. Wenn man diese synchrone Freisetzung aber mit Hilfe eines Ca^{2+} -Ionophors erreicht, besteht die große Gefahr, dass man die Merozoiten dabei schädigt. In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, *N. caninum*-Merozoiten synchron aus reifen Schizonten freizusetzen, indem die Wirtszellen (BSLEC) mit ATP stimuliert wurden. Eine Schädigung der Merozoiten ist hierbei nicht zu erwarten. Außerdem blieben Wirtszellen, die Parasiten früherer Stadien enthielten, intakt. Dadurch ist eine Weiterkultivierung der Zellen möglich, und Zellen, in denen die Schizogonie noch nicht beendet ist, sind nicht verloren. Die Stimulation der Wirtszellen mit einem Botenstoff, der die $[Ca^{2+}]_i$ erhöht, ist also in jedem Falle einem Ca^{2+} -Ionophor vorzuziehen. Da wohl für fast jede denkbare Wirtszelle ein Ca^{2+} -stimulierender Botenstoff gefunden werden kann, ließe sich in jedem individuellen Fall überprüfen, ob ein „zelleigener“ physiologischer Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ als Auslöser für den Egress von Merozoiten dienen kann.

Zusammenfassend betrachtet wurden in dieser Arbeit einige zum Teil kontrovers diskutierte Aspekte von Kokzidieninfektionen aufgegriffen. Auch wenn aufgeworfene Fragen nicht endgültig beantwortet wurden, so konnten doch Ergebnisse erzielt werden, die den heutigen Wissensstand erweitern, zur Klärung strittiger Punkte beitragen und Anregung für weitere Forschungsarbeiten bieten.

Der bei *E. bovis* gezeigte alternative Mechanismus der Zellinvasion, der ein bei Kokzidien-Sporozoiten verbreiteter Mechanismus zu sein scheint, bietet eine Erklärung für die

kontroversen Beobachtungen zum Infektionsmechanismus von Kokzidien. Die Ähnlichkeit der PV in *E. bovis*-infizierten VERO-Zellen mit der PV1 in *T. gondii*-infizierten deutet darauf hin, dass die PV Veränderungen erfährt, die für die Entwicklung des intrazellulären Parasiten essentiell sind. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass eine moderate, physiologische Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ der Wirtszelle den Egress des Parasiten auslösen kann. Es gelang nicht, ein für Patch-Clamp-Studien erfolgversprechendes in-vitro-Infektions-Modell für *E. bovis* zu etablieren. Während der langen Entwicklungszeit der *E. bovis*-Sporozoiten erreichten die Wirtszellen ein konfluentes Stadium, in welchem nach der Ausbildung von „gap junctions“ die elektrische Kopplung benachbarter Zellen Ganzzellableitungen verhinderte. Zudem stehen für die *E. bovis*-Sporozoiten nur sehr wenige und elektrophysiologisch kaum oder gar nicht charakterisierte Wirtszellen zur Verfügung. Hier scheinen Untersuchungen mit *T. gondii*-Tachyzoiten aufgrund der kürzeren Entwicklungszeit und dessen Eigenschaft, alle kernhaltigen Zellen zu befallen, aussichtsreicher.

5 Zusammenfassung/Summary

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte kokzidieller Infektionen in vitro untersucht.

Mechanismus der Zellinvasion

In vitro konnte bei *E. bovis*-Infektionen oft beobachtet werden, dass Sporozoiten ihre Wirtszelle wieder verlassen, um eine neue Zelle zu befallen. Mit Hilfe einer Standardmethode zum Nachweis von Verletzungen der Zellmembran wurde gezeigt, dass *E. bovis*-Sporozoiten in bovine Endothelzellen eindringen können, indem sie deren Plasmamembran durchbrechen. *E. bovis*-Sporozoiten befielen auch VERO- und HT29-Zellen, jedoch offensichtlich ohne deren Zellmembran zu verletzen. Auch bei der Invasion boviner Endothelzellen durch Tachyzoiten von *T. gondii* bzw. *N. caninum* kam es nicht zu Verletzungen der Zellmembran. In Übereinstimmung mit einem Bericht über *Plasmodium yoelii* könnte dieser Mechanismus der Zellinvasion ein gemeinsames Merkmal der Kokzidien-Sporozoiten, nicht aber der -Merozoiten sein.

Permeabilität der Parasitophoren Vakuole

Bei *E. bovis*-infizierten VERO-Zellen boten die membrangängigen AM-Ester der ionensensitiven Farbstoffe eine nichtinvasive Methode zur Untersuchung der Permeabilität der Membran der Parasitophoren Vakuole (PVM) und gleichzeitigen Messung von pH und $[Ca^{2+}]$ in Parasit, Parasitophorer Vakuole (PV) und Wirtszelle. Die Verteilung der Fluoreszenzfarbstoffe in diesen Kompartimenten infizierter Zellen sprach gegen die Existenz nichtselektiver Poren in der PVM. Auch für die Existenz einer Verbindung zwischen PV und extrazellulärem Medium („parasitophorous duct“) gab es keine Hinweise.

Intrazelluläre Ionenkonzentrationen und Signalwege

Während der pH innerhalb von PV und Parasit leicht niedriger war als im Zytosol der *E. bovis*-infizierten VERO-Zellen, unterschied sich die $[Ca^{2+}]$ in diesen Kompartimenten nicht signifikant. In keinem der untersuchten Modelle unterschied sich die $[Ca^{2+}]_i$ infizierter Zellen von der in nicht infizierten Kontrollzellen. Ein Hinweis auf einen Einfluss

auf Signalwege der Wirtszelle zeigte sich im Rahmen der eingesetzten Kokzidien nur in *E. separata*-infizierten HT29-Zellen. Hier war 24 Stunden nach der Infektion die Ca^{2+} -Antwort auf extrazelluläres ATP signifikant reduziert.

Patch-Clamp-Experimente mit *E. bovis*-infizierten Zellen

Die untersuchten Parasit-Wirtszell-Modelle waren für Patch-Clamp-Untersuchungen nicht gut geeignet. Bei den *E. bovis*-infizierten BSLEC stellte sich die langsame Entwicklung der Sporozoiten als Problem heraus. Intrazelluläre Sporozoiten reagierten auf die Manipulationen der Patchpipette an der Wirtszelle und begannen sich zu bewegen, was dann zum Verlust des Seals führte. Ganzzellaableitungen an späteren Stadien scheiterten, da die Wirtszellen dann in engem Kontakt zu den Nachbarzellen standen. Die elektrische Kopplung benachbarter Zellen (über gap junctions) verhinderte Ganzzellaableitungen.

Kalzium-induzierter Egress von Kokzidien aus Wirtszellen

In der Literatur gibt es einige Berichte darüber, dass die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Wirtszelle den Egress des Parasiten provoziert. In allen diesen Fällen wurde die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ allerdings mit Hilfe von Kalziumionophoren oder durch Mikroinjektion so stark und anhaltend erhöht, wie es in einer intakten Zelle niemals vorkommt. In dieser Arbeit wurde am Beispiel von *E. bovis*-infizierten BSLEC zum ersten mal gezeigt, dass eine physiologische Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Wirtszelle (nämlich ein durch Stimulation purinerger Rezeptoren ausgelöstes intrazelluläres Ca^{2+} -Signal) genügt, um den Egress eines Parasiten zu provozieren. Außerdem wurde gezeigt, dass die Freisetzung von *N. caninum*-Merozoiten aus reifen Schizonten ebenfalls durch ein solches Ca^{2+} -Signal der Wirtszelle induziert werden kann.

Summary

In this study, different aspects of coccidial infections have been investigated in vitro.

Alternative mechanism of cell invasion

In vitro, *Eimeria bovis* sporozoites often could be observed leaving their host cell to invade a new one. Contrary to the classical way of infecting a cell by forming a parasitophorous vacuole, a standard “cell wound assay” has shown that *E. bovis* can invade bovine endothelial cells by breaching the plasma membrane. *E. bovis* sporozoites also infected VERO and HT29 cells but obviously without damaging the plasma membrane. Neither did tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* breach the host cells plasma membrane when infecting bovine endothelial cells. According to a literature report dealing with *Plasmodium yoelii* sporozoites, breaching the membrane of certain host cells may be a common phenomenon for coccidian sporozoites, but may not be for merozoites.

Permeability of the parasitophorous vacuole membrane (PVM)

Loading *E. bovis* infected VERO cells with membrane permeant AM-esters of ion sensitive dyes provided a non-invasive method for investigation of the permeability of the PVM and simultaneous measurement of Ca^{2+} and H^+ concentrations inside the parasite, the vacuolar space and the host cell. The distribution patterns of the cleaved membrane impermeant dyes argue against the existence of nonselective pores in the PVM. There is also no indication for a parasitophorous duct connecting the vacuolar space with extracellular media.

Intracellular ion concentrations and signalling

The pH inside the PV and the parasite was lower than in the cytoplasm of the VERO host cell, whereas the $[\text{Ca}^{2+}]$ in these compartments did not differ significantly. In none of the investigated parasite-host cell-models, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of infected cells differed from noninfected controls. In HT29 cells infected with *E. separata* for 24 h the Ca^{2+} response to extracellular ATP was significantly reduced, indicating influences on the host cell's intracellular signalling.

Patch clamp studies on *E. bovis*-infected cells

The accessibility of the investigated parasite-host cell models to patch clamp studies was rather limited. The slow development of *E. bovis* sporozoites in BSLEC cells turned out to be a problem. In early stages, manipulation on the host cell with the patch pipette led to movements of the intracellular sporozoite which resulted in the loss of the seal. With ongoing development of the intracellular parasite, host cells grew more and more confluent and, by means of electric coupling via gap junctions, became inaccessible for whole cell recordings.

Calcium induced egress of coccidia from host cells

It is reported that elevation of host cell $[Ca^{2+}]_i$ provokes parasite egress. But, in all studies dealing with Ca^{2+} triggered Egress, $[Ca^{2+}]_i$ was excessively and sustained elevated by ionophores or microinjection, constituting conditions not to be found in intact living cells. Here, in *E. bovis* infected BSLEC cells, a moderate, physiologic elevation of $[Ca^{2+}]_i$ evoked by purinergic stimulation was sufficient to provoke parasite egress. Furthermore, release of *N. caninum* merozoites from mature schizonts also could be induced by this purinergic activated Ca^{2+} signal.

6 Literaturverzeichnis

- Adovelande, J., Bastide, B., Deleze, J. und Schrevel, J. (1993). Cytosolic free calcium in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and the effect of verapamil: a cytofluorimetric study. *Exp. Parasitol.* (76): 247-258.
- Behrendt, J.H., Milde, H., Weber, W.-M., Kowalik, S., Zahner, H., Bürger, H.-J. und Clauss, W. (2000). Intracellular calcium and pH conditions of cultured cells infected with *Eimeria bovis* or *E. separata*. *Parasitol. Res.* (86): 294-300.
- Black, M.W., Arrizabalaga, G. und Boothroyd, J.C. (2000). Ionophore-resistant mutants of *Toxoplasma gondii* reveal host cell permeabilization as an early event in egress. *Mol. Cell. Biol.* (20): 9399-9408.
- Bliska, J.B., Galan, J.E. und Falkow, S. (1993). Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* (73): 903-920.
- Bouchot, A., Millot, J.M., Charpentier, S., Bonhomme, A., Villena, I., Aubert, D. und Pinon, J.M. (2001). Membrane potential changes after infection of monocytes by *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* (31): 1114-1120.
- Bürger, H.-J. (1983). *Eimeria*-Infektionen beim Rind. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* (96): 350-357.
- Bürger, H.-J., Fiege, N., Gahr, A., Heise, A. und Roloff, H. (1995). *Eimeria* species of cattle. In: J.Eckert, R.Braun, M.W.Shirley und P.Coudert (Hrsg.), *Biotechnology: Guidelines on techniques in coccidiosis research.* 40-51. ECSC-EC-EAEC, Brussels, Luxembourg
- Carruthers, V.B. und Sibley, L.D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* (31): 421-428.
- Chobotar, B., Danforth, H.D. und Entzeroth, R. (1993). Ultrastructural observations of host-cell invasion by sporozoites of *Eimeria papillata* in vivo. *Parasitol. Res.* (79): 15-23.
- Clapham, D.E. (1995). Calcium signaling. *Cell* (80): 259-268.
- Cummins, M.M., O'Mullane, L.M., Barden, J.A., Cook, D.I. und Poronnik, P. (2000). Purinergic responses in HT29 colonic epithelial cells are mediated by G protein α -subunits. *Cell Calcium* (27): 247-255.
- Danforth, H.D., Chobotar, B. und Entzeroth, R. (1984). Cellular pathology in mouse embryonic brain cells following in vitro penetration by sporozoites of *Eimeria papillata*. *Z. Parasitenkd.* (70): 165-171.
- Danforth, H.D., Entzeroth, R. und Chobotar, B. (1992). Scanning and transmission electron microscopy of host cell pathology associated with penetration by *Eimeria papillata* sporozoites. *Parasitol. Res.* (78): 570-573.

- Dauguschies, A., Akimaru, M. und Bürger, H.-J. (1986). Experimentelle *Eimeria bovis* Infektionen beim Kalb: 1. Parasitologische und klinische Befunde. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. (93): 393-397.
- Davies, P.F. (1995). Flow-mediated endothelial mechanotransduction. Physiol. Rev. (75): 519-560.
- Desai, S.A., Krogstad, D.J. und McCleskey, E.W. (1993). A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. Nature (362): 643-646.
- Desai, S.A. und Rosenberg, R.L. (1997). Pore size of the malaria parasite's nutrient channel. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (94): 2045-2049.
- Docampo, R. und Moreno, S.N.J. (1996). The role of Ca^{2+} in the process of cell invasion by intracellular parasites. Parasitol. Today (12): 61-65.
- Dönges, J. (1988). Parasitologie: Mit besonderer Berücksichtigung humanpathogener Formen. (2. Aufl.). Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S. und Topper, M.J. (1988). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. J. Am. Vet. Med. Assoc. (193): 1259-1263.
- Dulbecco, R. und Vogt, M. (1954). Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J. Exp. Med. (99): 167-175.
- Eilam, Y., El On, J. und Spira, D.T. (1985). Leishmania major: excreted factor, calcium ions, and the survival of amastigotes. Exp. Parasitol. (59): 161-168.
- Ellison, S.P., Greiner, E. und Dame, J.B. (2001). In vitro culture and synchronous release of *Sarcocystis neurona* merozoites from host cells. Vet. Parasitol. (95): 251-261.
- Endo, T., Sethi, K.K. und Piekarski, G. (1982). *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. Exp. Parasitol. (53): 179-188.
- Entzeroth, R., Mattig, F.R. und Werner-Meier, R. (1998). Structure and function of the parasitophorous vacuole in *Eimeria* species. Int. J. Parasitol. (28): 1015-1018.
- Ernst, J.V. und Benz, G.W. (1981). Coccidiosis. In: M.Ristic und I.McIntyre (Hrsg.), Diseases of cattle in the tropics. 377-392. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht
- Ernst, J.V. und Benz, G.W. (1986). Intestinal coccidiosis in cattle. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. (2): 283-291.
- Evans, R., Chatterton, J.M., Ashburn, D., Joss, A.W. und Ho-Yen, D.O. (1999). Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. (18): 879-884.
- Fayer, R. und Hammond, D.M. (1967). Development of first-generation schizonts of *Eimeria bovis* in cultured bovine cells. J. Protozool. (14): 764-772.

- Felder, C.C. (1995). Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J.* (9): 619-625.
- Fiege, N., Klatte, D., Kollmann, D., Zahner, H. und Bürger, H.-J. (1992). *Eimeria bovis* in cattle: colostral transfer of antibodies and immune response to experimental infections. *Parasitol. Res.* (78): 32-38.
- Fischer, H., Illek, B., Negulescu, P.A., Clauss, W. und Machen, T.E. (1992). Carbachol-activated calcium entry into HT-29 cells is regulated by both membrane potential and cell volume. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (89): 1438-1442.
- Fitzgerald, P.R. (1980). The economic impact of coccidiosis in domestic animals. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* (24): 121-143.
- Gao, J., Zhao, J., Rayner, S.E. und Van Helden, D.F. (1999). Evidence that the ATP-induced increase in vasomotion of guinea-pig mesenteric lymphatics involves an endothelium-dependent release of thromboxane A₂. *Br. J. Pharmacol.* (127): 1597-1602.
- Garnham, P.C., Bird, R.G., Baker, J.R. und Kilck-Kendrick, R. (1969). Electron microscope studies on the motile stages of malaria parasites. VII. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* (63): 328-332.
- Gazarini, M.L., Thomas, A.P., Pozzan, T. und Garcia, C.R. (2003). Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. *J. Cell Biol.* (161): 103-110.
- Geletyuk, V.I., Kazachenko, V.N., Chemeris, N.K. und Fesenko, E.E. (1995). Dual effects of microwaves on single Ca²⁺-activated K⁺ channels in cultured kidney cells *Vero*. *FEBS Lett.* (359): 85-88.
- Ginsburg, H. (1994). Transport pathways in the malaria-infected erythrocyte. Their characterization and their use as potential targets for chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* (48): 1847-1856.
- Groschner, K. und Kukovetz, W.R. (1992). Voltage-sensitive chloride channels of large conductance in the membrane of pig aortic endothelial cells. *Pflügers Arch.* (421): 209-217.
- Hafting, T. und Sand, O. (2000). Purinergic activation of BK channels in clonal kidney cells (Vero cells). *Acta Physiol. Scand.* (170): 99-109.
- Haldar, K. (1994). Ducts, channels and transporters in *Plasmodium*-infected erythrocytes. *Parasitol. Today* (10): 393-395.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. und Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* (391): 85-100.
- Hammond, D.M. (1973). Life cycles and development of coccidia. In: D.M.Hammond (Hrsg.), *The coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma and related genera.* 46-79. University Park Press, Baltimore

- Hammond, D.M., Bowman, G.W., Davis, L.R. und Simms, B.T. (1946). The endogenous phase of the life cycle of *Eimeria bovis*. J. Parasitol. (32): 409-427.
- Han, Y.S., Thompson, J., Kafatos, F.C. und Barillas-Mury, C. (2000). Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. EMBO J. (19): 6030-6040.
- Heise, A., Barbisch, B., Kressin, M., Bürger, H.-J. und Zahner, H. (1997). In vitro cultivation of *Eimeria bovis*. Zentralbl. Bakteriolog. A (286): 213-214.
- Hermosilla, C., Barbisch, B., Heise, A., Kowalik, S. und Zahner, H. (2002). Development of *Eimeria bovis* in vitro: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells. Parasitol. Res. (88): 301-7.
- Hibbs, A.R., Stenzel, D.J. und Saul, A. (1997). Macromolecular transport in malaria-does the duct exist? Eur. J. Cell Biol. (72): 182-188.
- Höpfner, M., Lemmer, K., Jansen, A., Hanski, C., Riecken, E.O., Gavish, M., Mann, B., Buhr, H., Glassmeier, G. und Scherubl, H. (1998). Expression of functional P2-purinergic receptors in primary cultures of human colorectal carcinoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. (251): 811-817.
- Hug, M.J., Pahl, C. und Novak, I. (1996). Calcium influx pathways in rat pancreatic ducts. Pflügers Arch. (432): 278-285.
- Inagami, T., Naruse, M. und Hoover, R. (1995). Endothelium as an endocrine organ. Annu. Rev. Physiol. (57:171-89.): 171-189.
- Jensen, J.B. (1975). Ultrastructure of the invasion of *Eimeria magna* sporozoites into cultured cells. J. Protozool. (22): 411-415.
- Johnstone, Colin (2000). *Eimeria bovis* - life cycle. In: Parasites and parasitic diseases of domestic animals - an online book of text and images. http://cal.vet.upenn.edu/merial/Protozoa/eimer_c.htm
- Joiner, K.A., Fuhrmann, S.A., Miettinen, H.M., Kasper, L.H. und Mellmann, I. (1990). *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in F_c receptor-transfected fibroblasts. Science (249): 641-646.
- Jones, F.E., Eyles, D.E., Coleman, N. und Gibson, C.L. (1958). A comparison of methods for the isolation of *Toxoplasma* from suspected hosts. Am. J. Trop. Med. Hyg. (7): 531-535.
- Jones, T.C. und Hirsch, J.G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. J. Exp. Med. (136): 1173-1194.
- Kao, J.P.Y. (1994). Practical aspects of measuring [Ca²⁺] with fluorescent indicators. Methods Cell Biol. (40): 155-181.

- Kazachenko, V.N. und Chemeris, N.K. (1998). Modulation of the activity of Ca^{2+} -activated K^+ channels by internal Mg^{2+} in cultured kidney cells vero. *Membr. Cell Biol.* (12): 489-511.
- Kennedy, C. (1990). P_1 - and P_2 -purinoceptor subtypes-an update. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* (303:30-50.): 30-50.
- Kochetkov, K.V., Kazachenko, V.N. und Marinov, B.S. (2000). Dose-dependent potentiation and inhibition of single Ca^{2+} -activated K^+ channels by flufenamic acid. *Membr. Cell Biol.* (14): 285-298.
- Kopp, R., Lambrecht, G., Mutschler, E., Moser, U., Tacke, R. und Pfeiffer, A. (1989). Human HT-29 colon carcinoma cells contain muscarinic M3 receptors coupled to phosphoinositide metabolism. *Eur. J. Pharmacol.* (172): 397-405.
- Kowalik, S., Clauss, W. und Zahner, H. (2004). *Toxoplasma gondii*: changes of transepithelial ion transport in infected HT29/B6 cell monolayers. *Parasitol. Res.* (92): 152-158.
- Kowalik, S. und Zahner, H. (1999). *Eimeria separata*: method for the excystation of sporozoites. *Parasitol. Res.* (85): 496-499.
- Kreusel, K.-M., Fromm, M., Schulzke, J.-D. und Hegel, U. (1991). Cl^- secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT29/B6). *Am. J. Physiol.* (261): C574-C582
- Krishna, S. und Squire-Pollard, L. (1990). Calcium metabolism in malaria-infected erythrocytes. *Parasitol. Today* (6): 196-198.
- Lauer, S.A., Rathod, P.K., Ghori, N. und Haldar, K. (1997). A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science* (276): 1122-1125.
- Lightowler, J.E. und Lightowler, N.M. (1971). Comparative mucolytic studies on dithiothreitol, N-acetyl-cystein and L-cystein on human respiratory mucus in vitro and their effects on the rate of flow in the mucus of the exposed trachea of the rat on topical application. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* (189): 53-58.
- Lingelbach, K. und Joiner, K.A. (1998). The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *J. Cell Science* (111): 1467-1475.
- McNeil, L., Clarke, M.F.S. und Miyake, K. (1999). Cell wound assays. In: I.J.S.Bonifacino, M.Dasso, J.B.Harford, J.Lippincot-Schartz und K.M.Yamada (Hrsg.), *Current Protocols in Cell Biology*. 12.4.1-12.4.15 Wiley, New York
- Meis, J.F., Verhave, J.P., Jap, P.H., Sinden, R.E. und Meuwissen, J.H. (1983). Malaria parasites--discovery of the early liver form. *Nature* (302): 424-426.
- Merlin, D., Augeron, C., Tien, X.-Y., Guo, X., Laboisie, C.L. und Hopfer, U. (1994). ATP-stimulated electrolyte and mucin secretion in the human intestinal goblet cell line HT29-Cl.16E. *J. Membr. Biol.* (137): 137-149.

- Misra, S., Naskar, K., Sarkar, D. und Ghosh, D.K. (1991). Role of Ca^{2+} ion on Leishmania-macrophage attachment. *Mol. Cell. Biochem.* (102): 13-18.
- Moerenhout, M., Himpens, B. und Vereecke, J. (2001a). Intercellular communication upon mechanical stimulation of CPAE- endothelial cells is mediated by nucleotides. *Cell Calcium* (29): 125-136.
- Moerenhout, M., Vereecke, J. und Himpens, B. (2001b). Mechanism of intracellular Ca^{2+} -wave propagation elicited by mechanical stimulation in cultured endothelial CPAE cells. *Cell Calcium* (29): 117-123.
- Mondragon, R. und Frixione, E. (1996). Ca^{2+} -dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J. Eukaryot. Microbiol.* (43): 120-127.
- Moreno, S.N., Silva, J., Vercesi, A.E. und Docampo, R. (1994). Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J. Exp. Med.* (180): 1535-1540.
- Morris, S.A., Tanowitz, H., Hatcher, V., Bilezikian, J.P. und Wittner, M. (1988). Alterations in intracellular calcium following infection of human endothelial cells with *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol* (29): 213-221.
- Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V. und Rodriguez, A. (2001). Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* (291): 141-144.
- Mota, M.M. und Rodriguez, A. (2001). Migration through host cells by apicomplexan parasites. *Microbes Infect.* (3): 1123-1128.
- Moudy, R., Manning, T.J. und Beckers, C.J. (2001). The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* (276): 41492-501.
- Nichols, B.A. und O'Connor, G.R. (1981). Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. *Lab. Invest.* (44): 324-335.
- Niggel, J., Sigurdson, W. und Sachs, F. (2000). Mechanically induced calcium movements in astrocytes, bovine aortic endothelial cells and C6 glioma cells. *J. Membr. Biol.* (174): 121-134.
- Nilius, B. und Droogmans, G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* (81): 1415-1459.
- Nilius, B., Viana, F. und Droogmans, G. (1997). Ion channels in vascular endothelium. *Annu. Rev. Physiol.* (59): 145-170.
- Nitschke, R., Leipziger, J. und Greger, R. (1993). Agonist-induced intracellular Ca^{2+} transients in HT29 cells. *Pflügers Arch.* (423): 519-526.

- Numberger, M. und Draguhn, A. (1996). Patch-Clamp-Technik. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.
- Olesen, S.P. und Bundgaard, M. (1992). Chloride-selective channels of large conductance in bovine aortic endothelial cells. *Acta Physiol. Scand.* (144): 191-198.
- Olivier, M. (1996). Modulation of host cell intracellular Ca^{2+} . *Parasitol. Today* (12): 145-150.
- Olivier, M., Baimbridge, K.G. und Reiner, N.E. (1992a). Stimulus-response coupling in monocytes infected with *Leishmania*. Attenuation of calcium transients is related to defective agonist-induced accumulation of inositol phosphates. *J. Immunol.* (148): 1188-1196.
- Olivier, M., Brownsey, R.W. und Reiner, N.E. (1992b). Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (89): 7481-7485.
- Pezella, N., Bouchot, A., Bonhomme, A., Pingret, L., Klein, C., Burlet, H., Balossier, P., Bonhomme, P. und Pinon, J.-M. (1997). Involvement of calcium and calmodulin in *Toxoplasma gondii* tachyzoite invasion. *Eur. J. Cell Biol.* (74): 92-101.
- Pinching, A.J. und Nye, K.E. (1990). Defective signal transduction-a common pathway for cellular dysfunction in HIV infection? *Immunol. Today* (11): 256-259.
- Pingret, L., Millot, J.M., Sharonov, S., Bonhomme, A., Manfait, M. und Pinon, J.-M. (1996). Relationship between intracellular free calcium concentrations and the intracellular development of *Toxoplasma gondii*. *J. Histochem. Cytochem.* (44): 1123-1129.
- Pirotton, S., Motte, S., Côte, S. und Boeynaems, J.-M. (1993). Control of endothelial function by nucleotides: multiple receptors and transduction mechanisms. *Cellular Signalling* (5): 1-8.
- Pouvelle, B., Spiegel, R., Hsiao, L., Howard, R.J., Morris, R.L., Thomas, A.P. und Taraschi, T.F. (1991). Direct access to serum macromolecules by intraerythrocytic malaria parasites. *Nature* (353): 73-75.
- Ralevic, V. und Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* (50): 413-492.
- Ravdin, J.I., Moreau, F., Sullivan, J.A., Petri, W.A., Jr. und Mandell, G.L. (1988). Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* (56): 1505-1512.
- Roberts, W.L., Speer, C.A. und Hammond, D.M. (1971). Penetration of *Eimeria larimerensis* sporozoites into cultured cells as observed with the light and electron microscopes. *J. Parasitol.* (57): 615-625.

- Rodriguez, A., Rioult, M.G., Ora, A. und Andrews, N.W. (1995). A trypanosome-soluble factor induces IP₃ formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J. Cell Biol.* (129): 1263
- Rommel, M. (2000). Eimeriosen des Rindes. In: M.Rommel, J.Eckert, E.Kutzer, W.Körting und T.Schnieder (Hrsg.), *Veterinärmedizinische Parasitologie*. 133-138. Parey, Berlin
- Sabin, A. (1941). Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Med. Assoc.* (116): 801-814.
- Scholtyssek, E. und Piekarski, G. (1965). Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Merozoiten von Eimerien: *Eimeria perforans*, *Eimeria stidaei*, und *Toxoplasma gondii*. *Z. Parasitenkd.* (26): 91-115.
- Schröpfer, E. (2003). Untersuchungen zum Einfluss von *Eimeria bovis*-Sporozoiten auf VERO-Zellen und Endothelzellen aus dem Rind. Inauguraldissertation. Institut für Tierphysiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen. URL: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2003/1169/>
- Schwab, J.C., Beckers, C.J. und Joiner, K.A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (91): 509-513.
- Shaw, M.K. (1995). Mobilization of intrasporozoite Ca²⁺ is essential for *Theileria parva* sporozoite invasion of bovine lymphocytes. *Eur. J. Cell Biol.* (68): 78-87.
- Sibley, L.D., Hakansson, S. und Carruthers, V.B. (1998). Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Curr. Biol.* (8): R12-R14
- Sibley, L.D., Weidner, E. und Krahenbuhl, J.L. (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* (315): 416-419.
- Sinai, A.P. und Joiner, K.A. (1997). Safe haven: The cell biology of nonfusigenic pathogen vacuoles. *Annu. Rev. Microbiol.* (51): 415-462.
- Sodeman, T., Schnitzer, B., Durkee, T. und Jcontacos, P. (1970). Fine structure of the exoerythrocytic stage of *Plasmodium cynomolgi*. *Science* (170): 340-341.
- Speer, C.A., Dubey, J.P., Blixt, J.A. und Prokop, K. (1997). Time lapse video microscopy and ultrastructure of penetrating Sporozoites, types 1 and 2 parasitophorous vacuoles, and the transformation of sporozoites to tachyzoites of the VEG strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* (83): 565-574.
- Speer, C.A., Tilley, M., Temple, M.E., Blixt, J.A., Dubey, J.P. und White, M.W. (1995). Sporozoites of *Toxoplasma gondii* lack dense-granule protein GRA3 and form a unique parasitophorous vacuole. *Mol. Biochem. Parasitol.* (75): 75-86.
- Staines, H.M., Powell, T., Thomas, S.L. und Clive, E.J. (2004). Plasmodium falciparum-induced channels. *Int. J. Parasitol.* (34): 665-673.

- Stommel, E.W., Kenneth, H.E., Schwartzmann, J.D. und Kasper, L.H. (1997). *Toxoplasma gondii*: Dithiol-induced Ca^{2+} flux caused egress of parasites from the parasitophorous vacuole. *Exp. Parasitol.* (87): 88-97.
- Tardieux, I., Nathanson, M.H. und Andrews, N.W. (1994). Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca^{2+} transients. *J. Exp. Med.* (179): 1017-1022.
- Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R. und Dawson, A.P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (87): 2466-2470.
- Tilley, M., Fichera, M.E., Jerome, M.E., Roos, D.S. und White, M.W. (1997). *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. *Infect. Immun.* (65): 4598-4605.
- Vieira, M.C.F. und Moreno, S.N.J. (2000). Mobilization of intracellular calcium upon attachment of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to human fibroblasts is required for invasion. *Mol. Biochem. Parasitol.* (106): 157-162.
- Voets, T., Droogmans, G. und Nilius, B. (1996). Membrane currents and the resting membrane potential in cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. *J. Physiol.* (497): 95-107.
- Weintraub, W.H., Negulescu, P.A. und Machen, T.E. (1992). Calcium signaling in endothelia: cellular heterogeneity and receptor internalization. *Am. J. Physiol.* (263): C1029-C1039
- Werner-Meier, R. und Entzeroth, R. (1997). Diffusion of microinjected markers across the parasitophorous vacuole membrane in cells infected with *Eimeria nieschulzi* (Coccidia, Apicomplexa). *Parasitol. Res.* (83): 611-613.
- Zieler, H. und Dvorak, J.A. (2000). Invasion in vitro of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (97): 11516-11521.

7 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Tierphysiologie bedanken. Allen voran bei Herrn Professor Dr. Wolfgang Clauß, der mir das Thema überlassen und einen mit Zellkultur, Konfokalmikroskop und Patch-Clamp-Apparatur hervorragend ausgestatteten Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt hat. Für die Möglichkeit am Fluorezensmikroskop mit Digitalkamera arbeiten zu können bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schwarz. Für die Betreuung der Zellkulturen bedanke ich mich bei Mirjam Buß und für die großartige Unterstützung in elektrischen und mechanischen Angelegenheiten bei Bernhard Kahnert und Siggie Kristek. Mein besonderer Dank gilt „meinen Postdocs“ Dr. Helga Milde und Dr. Ursula Eckstein-Ludwig sowie Dr. Elmar Schröpfer, die alle am „Eimerien-Projekt“ beteiligt waren und immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Weiter danke ich Herrn Prof. Dr. Fritz Jauker für seinen Rat in Statistik-Fragen und Walburga Hofmann, die mich freundlich „im 3. Stock aufgenommen hat“, wo ich mich beim Zusammenschreiben so richtig ausbreiten konnte. Nicht zuletzt für unzählige gemeinsame Mittagessen in der Mensa danke ich den Diplomanden und Doktoranden und allen anderen Institutsangehörigen für das freundliche Arbeitsklima.

Ebenso geht mein Dank an die Mitarbeiter des Instituts für Parasitologie, vor allem an Herrn Prof. Dr. Horst Zahner und Herrn Dr. Carlos Hermosilla, die sehr viel Engagement in dieser Zusammenarbeit gezeigt und so wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Nicht vergessen möchte ich an dieser Stelle die Mitarbeiter des Instituts für Parasitologie, die an der Produktion der Parasiten und deren Aufreinigung beteiligt waren.

Nicht nur für seinen Rat, sondern auch für seine tatkräftige Unterstützung bei den Versuchen an „unseren BSLEC“ eine Whole-Cell-Konfiguration herzustellen bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Andreas Koschinski aus dem Institut für Pharmakologie. Für fachliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach aus dem Fachbereich Biologie/Zoologie der Universität Marburg.

Für die finanzielle Unterstützung durch ein Graduiertenstipendium des Landes Hessen möchte ich mich nicht nur bei der Universität Gießen bedanken, die dieses Stipendium vergeben hat, sondern vor allem bei den hessischen Steuerzahlern, die es ja schließlich bezahlt haben.

Zum Abschluss möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und mir auch finanziell unter die Arme gegriffen haben.

8 Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die anderen Werken im Wortlaut oder sinngemäß entnommen wurden sowie übernommene Abbildungen, sind mit Quellenangaben kenntlich gemacht.

Gießen, im September 2004

.....
(Jan Behrendt)